

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Ruzicka

**Einfluss unterschiedlicher Laktobazillus-Arten auf die experimen-
telle Vaginalkandidose durch *C. albicans***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolf-Georg Schulz
aus Managua/Nicaragua
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. C. Korting

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E.R. Weissenbacher
Priv. Doz. Dr. F. Ebel

Mitbetreuung durch
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. K. Merk

Dekan: Prof. Dr. med. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2008

Meinen geliebten Eltern

1	Einleitung	3
1.1	Laktobazillen und Probiotika	3
1.1.1	Definition des Begriffes „Probiotikum“	3
1.1.2	Eigenschaften von probiotischen Bakterienstämmen	4
1.1.3	Anwendung typischer Stämme in kommerziell verfügbaren Produkten	5
1.1.4	Eigenschaften von Laktobazillen	5
1.1.5	Anwendung von Laktobazillen	6
1.1.6	Protektive und therapeutische Wirkung von Laktobazillen bei urogenitalen Infektionen	9
1.2	Vaginalkandidose	11
1.2.1	<i>Candida albicans</i>	11
1.2.2	Therapie der Vaginalkandidose	12
1.3	Zytokine	13
1.4	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Probengewinnung	14
2.1.1	Herkunft der verwendeten Laktobazillen-Stämme	14
2.1.2	Anzüchtung	14
2.1.3	Speziesklassifikation mittels API 50CH	15
2.1.4	Synchronisation / Einstellung der Keimdichte der Laktobazillen	15
2.1.5	Hitze-inaktivierte Präparation von <i>L. rhamnosus</i> GG	16
2.1.6	Verwendung von D-Laktat	16
2.1.7	Verwendeter <i>C. albicans</i> -Stamm	16
2.2	Ex-vivo Vaginalschleimhautmodell	17
2.3	Versuchsdesign	17
2.3.1	Infektion mit Laktobazillen-Stämmen	17
2.3.2	Infektion mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC 5314	18
2.3.3	Gleichzeitige Infektion mit Laktobazillen und <i>C. albicans</i>	18
2.3.4	Zeitversetzte Infektion mit Laktobazillen und <i>C. albicans</i>	18
2.3.5	Infektion mit D-Laktat	18
2.3.6	Gleichzeitige Infektion mit D-Laktat und <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	19
2.3.7	Zeitversetzte Infektion mit D-Laktat und <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	19
2.4	Lichtmikroskopie	19
2.4.1	Fixierung und Einbettung	19
2.4.2	Semidünnschnitt und lichtmikroskopische Untersuchung	20
2.5	RT-PCR	20

Inhaltsverzeichnis	2
2.5.1 Gesamt-RNA-Extraktion	20
2.5.2 Photometrische Messung	21
2.5.3 DNase-Verdau und reverse Transkriptase	22
2.5.4 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	22
2.5.5 Quantitative PCR-Analyse und verwendete Primer	23
2.5.6 Housekeeping-Gene und relative Quantifizierung	26
2.5.7 Crossing-Point	26
2.6 LDH-Messung	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Laktobazillen-Spezies-Klassifizierung	28
3.2 Ex-vivo-Untersuchungen zur Bedeutung von Laktobazillen bei der vaginalen Kandidose	28
3.2.1 Morphologie des nicht-infizierten RHVE	29
3.2.2 Morphologie des RHVE nach Infektion mit Laktobazillen	31
3.2.3 Morphologie des RHVE nach Infektion mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	33
3.2.4 Morphologie des RHVE nach Infektion mit Laktobazillen und <i>C. albicans</i> Wild- typ SC5314	35
3.2.5 Morphologie des RHVE nach primärer Infektion mit Laktobazillen und se- kundärer Infektion mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314	37
3.2.6 Morphologie des RHVE nach primärer Infektion mit <i>C. albicans</i> Wildtyp SC5314 und sekundärer Infektion mit Laktobazillen	39
3.3 Quantitative RT-PCR Analyse	41
3.4 LDH-Bestimmung	49
4 Diskussion	53
5 Zusammenfassung	58
6 Verzeichnis der Abbildungen	60
7 Verzeichnis der Tabellen	65
8 Anhang	69
8.1 Tabellen	69
8.2 Abbildungen	76
9 Literaturverzeichnis	85
10 Danksagung	92
11 Lebenslauf	93

1 Einleitung

Laktobazillen und Probiotika

Definition des Begriffes „Probiotikum“

Über viele Jahre ergaben sich für Probiotika mehrere Definitionsansätze, die durch das Verständnis ihres Wirkungsmechanismus und ihrer Wirkung auf Gesundheit und Wohlbefinden des Organismus geprägt sind.

Der Terminus „probiotisch“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet ursprünglich „für das Leben“. Bereits 1908 schrieb Metchnikoff den milchsäurebildenden Mikroorganismen die Fähigkeit zu, „schädliche Keime“ im Darm zurückzudrängen und die Belastung des Organismus durch deren schädliche Stoffwechselprodukte zu vermindern. Er postulierte weiterhin, dass die Einnahme von Laktobazillen-haltigem Joghurt eine Reduktion der Toxin-produzierenden Bakterien im Magen bewirken würde (36).

Tissier empfahl Kindern, die an Durchfall leiden, die Einnahme von Bifidobakterien, da diese die Durchfall verursachenden Bakterien verdrängen. Des Weiteren zeigte er, dass Bifidobakterien der hauptsächlich vorkommende Keim im Darm von Säuglingen sind, die gestillt wurden (69).

Lilly und Stillwell benutzten den Ausdruck „Probiotikum“ 1965 erstmals und beschrieben damit „Substanzen, die von einem Mikroorganismus ausgeschüttet werden und dadurch das Wachstum eines anderen Mikroorganismus stimulieren“ und die somit das Gegenteil von Antibiotika bewirken (31).

Parker war dann 1974 derjenige, der den Begriff „Probiotikum“ in seiner heute gültigen Form als Erster gebrauchte. Er definierte sie als Substanzen und Organismen, die zum Gleichgewicht der Darmflora beitragen. Durch den Zusatz „Substanzen“ schloss er in seiner Definition Antibiotika bis dahin nicht aus (43).

Eine neuere Definition stammt von Fuller aus dem Jahr 1989. Er bezeichnete Probiotika als lebende Mikroorganismen, die der Nahrung beigelegt werden, in ausreichender Menge in den Darm gelangen und hier positive gesundheitsfördernde Wirkungen erzielen (15).

Havenaar und Huis in't Veld erweiterten Fullers Definition, um neben Nahrungsmitteln auch andere Stoffgruppen und außer einzelnen Bakterien auch gemischte Kulturen im Gebrauch einzuschließen (21).

Salminen et al. bezeichneten 1998 Probiotika als lebende mikrobielle Nahrungsbestandteile, die positive Effekte auf die menschliche Gesundheit haben (53).

Im Jahr 1999 erklären sie: „Probiotika sind mikrobielle Zellzubereitungen oder Bestandteile von mikrobiellen Zellen, die positive Effekte auf Gesundheit und Wohlbefinden des Wirtes haben.“ Sie schlossen somit auch nicht lebende Mikroorganismen und deren Zellbestandteile ein, bei denen ebenfalls eine gesundheitsfördernde Wirkung beobachtet wurde (52).

Schrezenmeir und de Vrese erweiterten im Jahre 2001 diese Definition, indem sie feststellten, dass Probiotika neben dem Darm auch andere Gewebe positiv beeinflussen können (59). Als weitere mögliche Wirkorte nannten sie Infektionen der Mundhöhle, des oberen Respirationstraktes und der Lungen, des Magens und des urogenitalen Traktes (60).

Bezogen auf alle genannten Definitionen, wird mittlerweile eine sehr große Anzahl an Mikroorganismen als Probiotika bezeichnet. Allerdings werden nur die Milchsäure-produzierenden Bakterienstämme (im englischen Sprachraum „lactic acid bacteria“ oder kurz LAB genannt) für die Herstellung von Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmitteln herangezogen (24). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die zu den Probiotika zählenden Mikroorganismen.

Laktobazillus-Spezies	Bifidobakterium-Spezies	Andere Milchsäure-produzierende Bakterien	Nicht Milchsäure-produzierende Bakterien
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Tabelle 1: Übersicht über die zu den Probiotika zählenden Mikroorganismen (24)

1.1.2 Eigenschaften von probiotischen Bakterienstämmen

Ein Bakterium muss über bestimmte funktionelle Eigenschaften verfügen, um eine protektive Wirkung auf den Organismus entfalten zu können und somit den Probiotika zugeordnet zu werden (40):

- Der einem Nahrungsmittel zugeführte Bakterienstamm muss resistent gegenüber Magen- und Gallensäuren sein, um die Passage in den Intestinaltrakt zu überleben und somit Zellintegrität, Adhäsionsfähigkeit und metabolische Aktivität zu bewahren.
- Die Fähigkeit, sich an intestinale Zellen binden zu können, muss gegeben sein. Dies ist wichtig für die vorübergehende Fähigkeit der Ansiedlung im Darm, die Immunmodulation, die kompetitive Hemmung pathogener Keime und die Produktion antimikrobieller Substanzen.

- Das Probiotikum muss industriell in großem Umfang leicht zu verarbeiten sein, die einfache Kultivierung und die Haltbarkeit im Produkt sollte gewährleistet sein (wenn lebende Mikroorganismen im Produkt enthalten sind).
- Letztlich muß der Nachweis einer erwünschten Wirkung im Sinne der Beseitigung oder Verhütung einer Krankheit gegeben sein.

All diese Eigenschaften kommen speziell den Laktobazillen zu, denen das Hauptaugenmerk dieser Arbeit gilt.

1.1.3 Anwendung typischer Stämme in kommerziell verfügbaren Produkten

Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmittel und pharmazeutische Produkte, die probiotische Stämme enthalten, werden in fermentierter Form oder lyophilisierter Form angeboten. Unter den Joghurt-Produkten dominieren Stämme der Spezies *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei* und der *Bifidobacterium*-Spezies. Zu den Stämmen, denen mittlerweile am längsten gesundheitsfördernde Eigenschaften zugesagt werden, gehören *L. casei* shirota und einige Stämme der *L. acidophilus*-Spezies. Die gesundheitsfördernde Wirkung und Sicherheit der Stämme *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* und *L. johnsonii* wurde in den letzten Jahren ausgiebig untersucht und dokumentiert (24, 51) .

1.1.4 Eigenschaften von Laktobazillen

Laktobazillen sind Gram-positive Stäbchen, die hauptsächlich fakultativ, aber auch strikt anaerob wachsen. Sie stellen einen Teil der normalen oralen, intestinalen und urogenitalen Mikroflora dar und spielen eine große Rolle bei der Prävention von Infektionen durch pathogene Erreger. Sie bevorzugen ein saures Milieu und tragen ihrerseits dazu auch durch Produktion von Milchsäure (Laktat) und anderen Säuren bei (3).

Laktobazillen stellen die größte Gruppe innerhalb der Milchsäure-produzierenden Bakterien. Sie enthalten eine sehr große Anzahl an Spezies, die vorwiegend menschlichen, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs sind (63).

Laktobazillen sind enthalten in Nahrungsmitteln wie Milch und Milcherzeugnissen, vor allem Käse und Joghurt, in Sauerkraut, Oliven, Rohwurst, Brot- und Backwaren. In der Agroindustrie finden sie bei der Herstellung von Silofutter Verwendung (7).

Beim gesunden Menschen finden sich Laktobazillen vorwiegend in der Mundhöhle, dem Ileum, dem Colon und vor allem in der Vagina (Tabelle 2) (3).

Körperregion	Anzahl Laktobazillen [angegeben in: Kolonien-bildende Einheiten pro Gramm (KbE/g)]
Mundhöhle	$10^3 - 10^4$ KbE/g
Ileum	$10^3 - 10^7$ KbE/g
Colon	$10^4 - 10^8$ KbE/g
Vagina	$10^7 - 10^8$ KbE/g

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl an Laktobazillen beim gesunden Menschen (3)

1.1.5 Anwendung von Laktobazillen

Die Anwendung von Laktobazillen und anderen Probiotika wurde in vielen verschiedenen Studien untersucht. Das derzeit am besten dokumentierte Anwendungsgebiet liegt in der Prävention und Therapie von Durchfallerkrankungen. Zurückzuführen ist dies auf eine Förderung der Barrierefunktion der Darmschleimhaut:

Probiotika bewirken eine Normalisierung der erhöhten intestinalen Permeabilität, des veränderten intestinalen Mikroklimas und der Steigerung der intestinalen IgA-Produktion.

Neben der Anwendung von Laktobazillen bei urogenitalen Infektionen, mit der sich diese Arbeit vor allem befasst, sind in der Literatur weitere Anwendungsgebiete von Laktobazillen und anderen Probiotika zu finden:

a) Therapie bei Laktoseintoleranz:

Eine der häufigsten Ursachen von Durchfallerkrankungen lässt sich auf eine Laktose-Malabsorption zurückführen, bedingt durch einen epithelialen Laktasemangel. In der Tat ist eine der am besten beschriebenen gesundheitsfördernden Wirkungen von Joghurt die Anwendung bei Laktoseintoleranz. Im Jahr 1984 zeigten Kolars et al (29) und Savaiano et al (55), dass Laktose bei Menschen mit Laktasemangel aus Joghurt sehr viel besser als aus Milch aufgenommen werden kann. Diese Ergebnisse wurden 1988 von Dewit et al. bestätigt (9). Hauptursache für diese Eigenschaft sind wahrscheinlich Mikroorganismen im Joghurt, die eine intraluminale Verdauung von Laktose fördern (22).

b) Therapie bei Durchfallerkrankungen

Seit langer Zeit wird die perorale Gabe von Probiotika bei der Behandlung von durch Rotaviren ausgelösten Diarrhöen bei Kindern empfohlen. Die Gabe von mit *L. rhamnosus* oder mit *L. reuteri* versetzter Milch oder die Zubereitung in Pulverform bewirkte eine Verkürzung des Krankheitsverlaufs (22). Eine europäische Multizenterstudie aus dem Jahr 2000 zeigte ebenfalls einen verkürz-

ten Krankheitsverlauf, sowie einen verkürzten stationären Aufenthalt bei Anwendung einer oralen Nährstofflösung mit Zusatz von *Lactobacillus GG*.

Bei den bakteriellen Formen der Diarrhöen existieren keine eindeutigen Ergebnisse. Wenngleich *in vitro* und bei Tierversuchen protektive und gesundheitsfördernde Effekte von Probiotika nachgewiesen wurden, fehlen überzeugende klinische Studien am Menschen. So beeinflusste die Gabe einer kommerziellen Zubereitung aus *L. acidophilus* und *L. bulgaricus* nicht die Dauer einer Infektion, die bei erwachsenen Freiwilligen durch Enterotoxin-bildende *E. coli*-Bakterienstämmen ausgelöst worden war (5, 6).

Bei einer anderen Studie zeigte sich allerdings nach Gabe einer mit *L. johnsonii*-La1 angereicherten Milch eine Reduktion der *H. pylori*-Dichte. Eine Auswirkung auf den Erfolg einer *H. pylori*-Eradikation konnte nicht demonstriert werden (12).

Bei der Behandlung der *Clostridium difficile*-Kolitis zeigte sich wiederum ein Erfolg bei einer kombinierten Gabe von *Lactobacillus GG* und einem Standard-Antibiotikum. Es zeigten sich positive Effekte sowohl auf das klinische Befinden als auch in Bezug auf das Wiederauftreten der Beschwerden im Intervall. Hier erscheint die Gabe von Probiotika Erfolg versprechend (17).

Im Hinblick auf Antibiotika-assoziierte Diarrhöen sowie durch Strahlentherapie bedingte Diarrhöen konnte ein mitunter signifikanter Nutzen von Probiotika gezeigt werden. So zeigte *Lactobacillus GG* eine heilende Wirkung bei Antibiotika-assoziiierter Diarrhöe (62). Bei Patienten, die mit Ampicillin behandelt worden waren, zeigte die Verabreichung von *L. acidophilus* und *L. bulgaricus* eine schützende Wirkung vor Diarrhöe (18). Durch die prophylaktische Anwendung von *L. acidophilus*- oder *L. rhamnosus*-Kulturen konnte in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie intestinale Nebenwirkungen im Rahmen einer Strahlentherapie effektiv verhindert werden (22).

c) Anwendung in der Therapie und Prävention bei atopischen Erkrankungen

Eine allergische Reaktion ist auf eine Dysregulation des Th1/Th2 Gleichgewichtes zurück zu führen. Normalerweise führt die Exposition gegenüber einem infektiösen Agens zu einer Stimulation von Th1-Lymphozyten. Bei diesem Weg, der so genannten zellvermittelten Immunität, kommt es zu einer Freisetzung von Zytokinen wie IFN-gamma, IL-2 und TNF-beta, welche wiederum eine Aktivierung von Makrophagen bewirkt. Eine Stimulation von Th2-Lymphozyten bewirkt wiederum eine Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die für die Antikörperproduktion (vor allem IgE) und Aktivierung von Eosinophilen verantwortlich sind. Th2-Zellen und die von ihnen sezernierten Zytokine vermitteln eine humorale Immunität, wie dies bei der Antwort auf parasitäre Infektionen und bei allergischen Reaktionen vorkommt (22).

Theoretisch schützt eine Th1-Antwort gegen allergische Erkrankungen, da sich Th1- und Th2-Antworten gegenseitig hemmen können. Gemäß der Hygiene-Hypothese wird vermutet, dass bei mangelnder Exposition gegenüber Allergenen eine Dysregulation zwischen Th1- und Th2-

Antwort ausgelöst wird. Die defensiven Mechanismen für parasitäre Infektionen, z.B. die Th2-Zytokinausschüttung und IgE-Antikörperproduktion, bleiben zwar erhalten, diese können jedoch im Sinne einer Überreaktion gegen Umweltfaktoren wie Nahrungs- oder Aeroallergene fehlgeleitet werden. Diese Dysbalance kann durch Gabe von Probiotika verringert werden (22).

Matsuzaki et al. zeigten im Jahr 2000, dass Mäuse nach Fütterung mit hitzeinaktivierten *L. casei*-Zubereitungen nach Immunstimulation mit Allergen (Ovalbumin) einen signifikant niedrigeren Wert von Ovalbumin-spezifischem IgE als bei nicht mit Probiotika gefütterten Mäusen vorweisen. Des Weiteren zeigten die mit *L. casei* gefütterten Mäuse eine höhere Th1-assoziierte Zytokinproduktion (IFN- γ und IL-2) sowie eine niedrigere Th2-assoziierte Zytokinproduktion (IL-4, IL-5 und IL-6). Dies lässt vermuten, dass unter dem Einfluss von *L. casei* eher eine Th1- als eine Th2-Antwort produziert wird und somit Laktobazillen eine Hemmung der Th2-Lymphozyten mit konsekutiver Reduktion der IgE-Produktion bewirken (33).

d) Anwendung in der Therapie und Prävention des atopischen Ekzems

Neben der Anwendung zur Therapie und Prävention von allergischen Erkrankungen liegt in der Therapie und Prävention des atopischen Ekzems ein vielversprechender Ansatz für den Einsatz von Probiotika, speziell Laktobazillen.

In einer randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie bei 27 Kindern mit manifestem atopischen Ekzem und Kuhmilchallergie verabreichten Isolauri et al. oral eine stark hydrolysierte Molkeaufbereitung, die entweder *Lactobacillus GG* oder *Bifidobacterium lactis* enthielt. Nach zweimonatiger Behandlung zeigte sich eine klinische Verbesserung des Hautbefundes. Zudem zeigte sich ein Absinken der Serumkonzentration von CD-4, einem Marker der T-Zellaktivierung, der vor allem bei chronisch entzündlichen Erkrankungen erhöht ist (25).

Rosenfeldt et al. konnten in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie bei 43 Kindern mit atopischem Ekzem nach peroraler Gabe von *L. rhamnosus* und *L. reuteri* ebenfalls eine subjektive Besserung des klinischen Befundes aufzeigen, allerdings zeigte sich bei ihnen keine Veränderung in der Zytokin-Expression (50).

Im Hinblick auf die Prävention erhielten in einer doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie von Kalliomäki et al. 132 schwangere Frauen 2-4 Wochen vor ihrem Geburtstermin täglich *Lactobacillus GG* (Gruppe 1) oder Placebo (Gruppe 2). Die Gabe von *Lactobacillus GG* wurde nach der Geburt bei den Kindern oder, bei stillenden Müttern, wahlweise den Müttern fortgeführt. Bei 35% der Kinder wurde im Alter von 2 Jahren ein atopisches Ekzem diagnostiziert. Gegenüber der Placebo-Gruppe war das Auftreten eines solchen atopischen Ekzems um die Hälfte reduziert (26).

Im Follow-up nach weiteren 2 Jahren zeigte sich bei 26,2% der mit Laktobazillen behandelten Kinder und bei 46,3% der mit Placebo behandelten Kinder ein atopisches Ekzem (27).

1.1.6 Protektive und therapeutische Wirkung von Laktobazillen bei urogenitalen Infektionen

Neben den eben genannten Anwendungen eignen sich Probiotika am besten für die Behandlung von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen des Urogenital-Traktes.

Döderlein war wahrscheinlich einer der Ersten, der die Auffassung vertrat, dass die in der Vagina vorkommenden Bakterien aus Kohlenhydraten Milchsäure produzieren, und somit das Wachstum von pathogenen Bakterien verhindern oder stören (10).

Die bakterielle Vaginose (Vaginitis), die vulvovaginale Kandidose (Vaginalkandidose) und die Harnwegsinfektion (Urinary tract infection oder kurz UTI) zählen mit mehr als 300 Millionen Fällen pro Jahr zu den drei weltweit am häufigsten auftretenden urogenitalen Erkrankungen beim weiblichen Geschlecht (8).

Obwohl eine effektive (Verhältnis geplantes – erreichtes Ziel) und effiziente (Verhältnis Nutzen – Aufwand) Behandlung vorhanden ist, kommt es bei der Behandlung von Langzeiterkrankungen häufig zu Rückfällen. Besonders komplizierte Fälle, bestehend aus einer Kombination einer rezidivierenden bakteriellen Vaginose und einer rezidivierenden Vaginalkandidose zeigen häufig keine adäquate Antwort auf eine Standardtherapie (46).

Vaginale Infektionen stehen häufig in Zusammenhang mit einer verringerten Anzahl von Laktobazillen, einer vermehrten Anzahl an pathogenen Mikroorganismen und einem mehr oder weniger stark geschädigten vaginalen Epithel.

Da eine antiinfektiöse Therapie, abhängig von der Art und der Dauer der Therapie, die Zahl an Laktobazillen zusätzlich senkt, ist eine Restitution einer intakten und gesunden Mikroflora ein wichtiger Bestandteil der Behandlungsplanung, um Rezidive und somit Reinfektionen zu vermeiden (41).

In der vaginalen Mikroflora dominieren bei prämenopausalen Frauen die Laktobazillen. Man vermutet, dass die Laktobazillen mittels verschiedener Mechanismen vor einer Infektion schützen:

- Das Anheften an und die Okkupation von spezifischen Rezeptoren an der Oberfläche des Epithels.
- Die Senkung und Aufrechterhaltung eines niedrigen pH in der Vagina, der das Wachstum von pathogenen Keimen verhindert.
- Die Produktion antimikrobieller Substanzen wie Milchsäure (Laktat), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Bakteriozinen.
- Die Produktion eines Biofilms, der die Adhäsion von pathogenen Keimen verhindert (46).

Einen weiteren entscheidenden Anteil an der Aufrechterhaltung der vaginalen Mikroflora nimmt der lokale Östrogen-Level. Bei einem sich im Gleichgewicht befindlichen Hormonhaushalt stellt eine normale Östrogenproduktion das ausreichende Wachstum und die Reifung von Vaginalepithel und die

ausreichende Versorgung mit Glykogen sicher. Glykogen dient den Laktobazillen als Nahrung. Erkrankungen der Vagina gehen üblicherweise mit einer Abnahme der Anzahl von Laktobazillen, einem übermäßigen Wachstum von pathogenen Keimen und einer mehr oder weniger starken Schädigung des Vaginalepithels einher (41).

In der Literatur gibt es zahlreiche Berichte mit viel versprechenden Ergebnissen über eine orale oder lokale Applikation von Joghurt in der Therapie der Vaginitis. Im Rahmen einer *in vitro*-Studie konnten McGroarty und Reid im Jahr 1988 zeigen, dass Laktobazillen imstande sind, die Anheftung von *E. coli* an uroepithelialen Zellen und deren Wachstum zu verhindern (34).

Hilton und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 1992 den Einfluss von oral konsumierten *L. acidophilus*-Keimen in Form von Joghurt. Bei der Gruppe, die Joghurt zu sich nahm, zeigte sich im Vergleich zur Gruppe, die keinen Joghurt zu sich nehmen durfte, eine signifikante Reduktion sowohl in der Häufigkeit der vulvovaginalen Kandidose als auch der Besiedelung durch *Candida albicans* (23).

Bei einer Gruppe von 28 Patientinnen mit vaginaler Kandidose, die eine lyophilisierte *L. acidophilus*-Aufbereitung lokal applizierte, zeigte sich bei 16 (57%) eine schnelle Normalisierung der vaginalen Flora im Vergleich zu der von mit Placebo behandelten Patientinnen (20). Bei Parent et al. ergab sich bei einem ähnlichen Versuchsaufbau mit lokal appliziertem *L. acidophilus* eine Heilungsrate von 88% gegenüber 22% in der Placebo-Gruppe (42).

Chimura und Mitarbeiter zeigten, dass bei Patienten mit bakterieller Vaginose nach drei Tagen topischer Anwendung von Joghurt keine gramnegativen Bakterien in der Vagina nachgewiesen werden konnten (4).

Die Gruppe um Reid und Mitarbeiter hat einen großen Anteil an der Forschung auf dem Gebiet der Behandlung von urogenitalen Infektionen:

In einer Studie mit 49 Patientinnen ergab die Anwendung von *L. rhamnosus* eine Reduzierung der Anzahl von urogenitalen Infektionen um 73% (45).

Dies korreliert mit einer *in-vitro* Studie, bei der *L. acidophilus* und *L. rhamnosus* eine Hemmung der Anheftung und des Wachstums von pathogenen Bakterien und *Candida*-Stämmen bewirkte (47).

Weiterhin konnten Reid et al. den prophylaktischen Nutzen von Laktobazillen zeigen. Nach der täglichen Einnahme von 3 ml einer probiotischen Suspension, die *L. rhamnosus* und *L. fermentum* enthielt, konnten bei 10 Frauen mit aktuell asymptomatischen rezidivierenden urogenitalen Infektionen innerhalb einer Woche beide Keime in der Vagina nachgewiesen werden. Die Scheidenflora normalisierte sich und innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 16 Monaten traten keine weiteren urogenitalen Infektionen auf (46).

1.2 Vaginalkandidose

Schätzungen gehen davon aus, dass 75% aller Frauen mindestens einmal in ihrem Leben an einer vulvovaginalen Kandidose erkranken (63). Von diesen erleiden 40-45% die Erkrankung zwei oder mehrmals. 5% der Frauen sind sogar von einer immer wiederkehrenden oder chronischen vulvovaginalen Kandidose, definiert als vier oder mehr Ereignisse im Jahr, betroffen. Haupterreger der Vulvovaginal-Kandidose ist - in 80-85% der Fälle - *C. albicans* (61).

Neben den subjektiven Beschwerden wie Juckreiz oder Brennen kommt es außerdem zu einem ausgeprägten Erythem und Ödemen im Bereich der Vulva, weißlichen, abwischbaren Auflagerungen an der Vagina und einem weißen, wässrigen bis sog. „cottage-cheese“-artigen Ausfluss. Der vaginale pH-Wert ist in der Regel unverändert und liegt bei pH 3,6-4,5 (19, 39, 54).

Bluestein et al. benennen die Schwangerschaft als einen der häufigsten prädisponierenden Faktoren für eine vulvovaginale Kandidose. Die Inzidenz sei in dieser Zeit, vor allem im dritten Trimenon, doppelt so hoch wie bei Nicht-Schwangeren (2). Bedingt durch einen hohen Östrogengehalt und einen damit verbundenen Anstieg an Glykogen in der Vaginalschleimhaut entsteht eine hervorragende Umgebung für eine Candida-Besiedelung. Ein beschleunigtes Wachstum von *C. albicans* durch Glykogen konnte bereits in-vitro nachgewiesen werden (72).

Als ein weiterer wichtiger prädisponierender Faktor für eine Vulvovaginal-Kandidose wird die Einnahme von Breitspektrum-Antibiotika angesehen. Da Penizilline, Cephalosporine und Tetracycline neben pathogenen Keimen auch protektiv wirksame Laktobazillen der Vagina hemmen, prädisponieren diese Medikamente für eine vermehrte Kolonisation mit *Candida* - von 10 auf 30% (2, 63).

Die vulvovaginale Kandidose tritt besonders bei Menschen im geschlechtsreifen Alter auf.

Als prädisponierende Faktoren für eine chronische vulvovaginale Kandidose zählen Krankheiten wie AIDS und Diabetes mellitus, eine Chemo- oder immunsuppressive Therapie sowie der Gebrauch von Antibiotika und Glukokortikoiden.

1.2.1 *Candida albicans*

Candida albicans gehört wie alle Pilze zu den eukaryontischen Mikroorganismen. Pilze werden in der Medizin in Dermatophyten, Hefen und Schimmelpilze nach dem sog. DHS-System nach Rieth eingeteilt, *Candida albicans* gehört zu den Hefen (44).

Innerhalb der Gattung *Candida* ist nur eine kleine Anzahl humanpathogen, davon spielt *C. albicans* mit 50-70% die größte Rolle, gefolgt von *Candida tropicalis* (10-20 %) und *Candida parapsilosis* sowie *Candida glabrata* (jeweils 10%) (38).

Bisher sind von etwa 50.000 verschiedenen Arten von Pilzen weniger als 300 als Krankheitserreger des Menschen bekannt. Die Bedeutung von *Candida*-Spezies als Krankheitserreger hat in den letzten

Jahren stetig zugenommen. So sind nahezu 80% aller Pilzinfektionen auf *C. albicans* zurückzuführen (57).

Candida albicans ist ein saprophytärer, grampositiver Keim, der bei 30-50% aller gesunden Menschen nachweisbar ist, ohne dass es zu Krankheitserscheinungen kommt. Treten allerdings prädisponierende Faktoren auf, wie z.B. eine Immunschwäche durch HIV-Infektion, Einnahme von Immunsuppressiva, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, Schwangerschaft, Antibiotikaeinnahme, oder auch einer andauernde lokale Belastung (z. B. andauernde Feuchtigkeit), kann eine Infektion mit dem opportunistischen Krankheitserreger *Candida albicans* zu oberflächlichen Infektionen von Haut- und Schleimhäuten führen. Diese zeigen sich in Form von weißlichen abstreifbaren Belägen, als sog. *Soor* (39, 57).

1.2.2 Therapie der Vaginalkandidose

In einer gemeinsam veröffentlichten Leitlinie der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft, der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft und der Arbeitsgemeinschaft für Infektionen und Infektionsimmunologie (AGII) der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe findet sich folgende Empfehlung zur Behandlung der Vaginalkandidose (1):

Es kann sowohl eine systemische als auch eine lokale Behandlung erfolgen. Die lokale Therapie erfolgt mit Polyenen (z.B. Nystatin, Amphotericin B), Imidazolen (z.B. Clotrimazol oder Miconazol) oder Ciclopiroxolamin-Vaginalia, für die orale Therapie sind Triazole im Handel.

Nach Friese und Mendling sind die Behandlungsergebnisse bei allen Präparaten nahezu gleich, allerdings wird wegen der besseren Compliance bei akuter Vaginalkandidose oft eine orale Triazolgabe bevorzugt (14).

Für den Fall, dass eine alleinige Lokalbehandlung nicht zum gewünschten Erfolg führt und weiterhin *C. albicans* bzw. andere *Candida*-Arten im Scheidensekret nachgewiesen werden, wird eine systemische Behandlung mit oralen Triazolen empfohlen. In Frage kommen Fluconazol und Itraconazol (68).

Zur Langzeitbehandlung der chronischen, rezidivierenden Vulvovaginalkandidose werden nach einer Initialtherapie mit Fluconazol 150 bis 300 mg oral intermittierende Erhaltungstherapien über Monate von 150mg Fluconazol einmal alle 1 bis 4 Wochen empfohlen (11, 68).

Weiterhin wird zusätzlich zur Triazol-Anwendung die topische Anwendung von Ciclopiroxolamin empfohlen (67).

1.3 Zytokine

Für die Abwehr einer Vaginalkandidose spielt die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle. Für die zelluläre Immunabwehr sind CD4⁺- T-Helferzellen verantwortlich, die in zwei Subtypen Th1 und Th2 unterteilt werden. Je nachdem, welcher Subtyp aktiviert wird, werden unterschiedliche Typen von Zytokinen sezerniert, die in der Vagina lokal eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation spielen.

Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen gehören in erster Linie Interleukin-1 (IL-1) (mit den Subtypen IL-1 α und IL-1 β), IL-6, TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) sowie das Chemokin GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor).

Zu den Th1-Typ Zytokinen gehören IL-2, Interferon (IFN)- γ und IL-12, während das Zytokin IL-10 den Th2-Typ Zytokinen zugerechnet wird. Das Zytokin IL-8 dient als Mediator einer akuten Entzündung zur Aktivierung, Chemotaxis und Adhäsion von Leukozyten (64).

1.4 Ziel der Arbeit

Neben der Behandlung von Krankheiten des Intestinaltraktes steht die Therapie und Prävention von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen des Urogenital-Traktes das meistversprechende Tätigkeitsfeld von Probiotika dar. Bakterielle Vaginose, Vulvovaginal-Kandidose und andere urogenitale Infektionen befallen jährlich weltweit mehr als 300 Millionen Frauen (8).

Zur Untersuchung der vaginalen Kandidose werden meist Tiermodelle verwendet. Da neben den ethischen Bedenken die mangelnde Übertragbarkeit vieler Ergebnisse einen erheblichen Nachteil der Tiermodelle darstellt, bieten so genannte *ex vivo*-Haut- und Schleimhautmodelle eine gute Alternative. So sollte in dieser Arbeit an Hand von einem etablierten *ex vivo*-Modell der vaginalen Kandidose, basierend auf einer rekonstruierten humanen Vaginalschleimhaut (56), der Einfluss unterschiedlicher Laktobazillen-Arten und -Varietäten auf den Verlauf der vaginalen Infektion untersucht werden. Außerdem wurde der Einfluss von D-Laktat, einem von Laktobazillen gebildeten Stoffwechselprodukt, auf einen möglichen Einfluss auf den Infektionsverlauf im rekonstruierten vaginalen Schleimhautepithel untersucht.

Neben der Beurteilung des im Lichtmikroskop sichtbaren Zellschadens an der rekonstruierten humanen Vaginalschleimhaut wurden die Zytokin-Expression auf Gen-Ebene gemessen und die Ergebnisse der unterschiedlichen Laktobazillen-Arten untereinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung

2.1.1 Herkunft der verwendeten Laktobazillus-Stämme

Insgesamt wurden fünf Laktobazillen-Stämme verwendet, wobei vier Stämme aus Nahrungsmitteln bzw. Nahrungsergänzungsmitteln stammen, deren Haupt-Wirkkomponente Laktobazillen sind.

Ein Laktobazillus-Stamm (Wildtyp A) wurde bei einer Patientin isoliert, die sich in der Poliklinik der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der LMU München wegen Verdacht auf eine Gonokokken-Infektion vorstellte. Bei einem Vaginal-Abstrich, der von dieser Patientin entnommen wurde, zeigte sich nach Anzüchtung auf Blutagarplatten neben dem Wachstum von *Neisseria gonorrhoeae* auch ein Wachstum eines Laktobazillen-Stammes, der zur weiteren Verwendung isoliert wurde.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Stämme:

Name	Herkunft	Enthaltener Stamm
LC1 [®]	LC1, Nestlé Deutschland AG, Frankfurt am Main, D	<i>L. johnsonii</i> LA1
Actimel [®]	Actimel, Danone GmbH, Haar, D	<i>L. casei defensis</i>
Yakult [®]	Yakult, Yakult Deutschland GmbH, Neuss, D	<i>L. casei shirota</i>
LGG [®]	LGG Kapseln, InfectoPharm Arzneimittel und Consilium GmbH, Heppenheim, D	<i>L. rhamnosus</i> GG
Wildtyp A	Vaginalabstrich humaner Herkunft	<i>L. acidophilus</i>

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Laktobazillus-Stämme

2.1.2 Anzüchtung

Die Anzüchtung der Stämme erfolgte für mindestens drei Tage im Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) bei 37 °C und 5% CO₂ auf de Man-Rogosa-Sharpe(MRS)-Agar-Platten (Difco, Detroit, USA) unter anaeroben Bedingungen (AnaeroGen, Oxoid, Basingstone, UK).

Jeweils 100 µl der verwendeten Produkte wurden auf eine MRS-Agar-Platte pipettiert und mit einem sterilen Drygalski-Spatel verteilt. Bei den Joghurt-Produkten (*LC1*, *Actimel* und *Yakult*) wurden diese 100 µl direkt aus dem Inhalt einer frisch geöffneten Verpackung entnommen. Bei dem Nahrungsergänzungsmittel *LGG* wurde der Inhalt einer Kapsel zunächst in 1000µl Aqua ad iniectabilia gelöst, danach wurden 100 µl auf eine MRS-Agar-Platte pipettiert. Nach drei Tagen wurde überprüft, ob ein Wachstum erfolgt war und ob neben dem Wachstum eines Laktobazillen-Stammes noch weitere Stämme, Verunreinigungen, etc. vorhanden waren. Dies war bei keiner der Proben der Fall. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die isolierten Laktobazillen-Stämme mit einer sterilen Platin-Impf-Öse in FKS (Fetales-Kälber-Serum) eingerieben und bei -80 °C gelagert.

2.1.3 Speziesklassifikation mittels API 50CH

Die biochemische Identifizierung der verwendeten Laktobazillen-Stämme erfolgte mit dem API 50 CHL Kit (bioMérieux, Lyon, F). Das Kit besteht aus dem API 50 CHL Medium und den API 50 CH Streifen und dient zur Identifizierung von Keimen der Gattung *Lactobacillus*. Das gebrauchsfertige Medium ermöglicht den Nachweis der Fermentation der 49 Kohlenhydrate im API 50 CH Streifen.

Der zu testende Keim wurde zunächst auf MRS-Agar anaerob für 24 Stunden angezüchtet (siehe 2.1.2). Von der gewachsenen Kultur wurde daraufhin mit einem Wattetupfer die Kultur von der MRS-Agarplatte abgenommen und in das API 50 CHL Medium eingerieben. Es musste eine Suspension hergestellt werden, deren Trübung dem McFarland 2-Trübungsstandard entspricht. Dies entspricht einer Bakterienkonzentration von ca. 6×10^8 Keimen/ml.

In die vorbereiteten API 50 CH Streifen wurden nun in jede der 49 Kammern einige Tropfen der eben hergestellten Suspension pipettiert. Jede der Kammern wurde daraufhin mit Paraffinöl überschichtet.

Die beimpften Kammern wurden daraufhin aerob für 48 Stunden bei 37 °C und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Während der Inkubation entstehen durch die Fermentation der Kohlenhydrate organische Säuren, die zu einem Farbumschlag des pH-Indikators führen. Nach 48 Stunden wurde jedes Röhrchen auf Säurebildung geprüft. Ein Farbumschlag des im Medium enthaltenen Indikators Bromkresolpurpur zur Farbe Gelb wurde im beigelegten Ergebnisblatt mit einem „+“ (positive Reaktion) vermerkt, ein fehlender Farbumschlag vom Ausgangsfarbtönen Purpur wurde mit einem „-“ (negative Reaktion) vermerkt. Beim Aesculin (Kammer Nr. 25) war bei positiver Reaktion ein Farbumschlag von Purpur nach Schwarz zu beobachten. Aus der Verteilung der positiven und negativen Reaktionen ergab sich ein spezifisches biochemisches Profil für die Stämme, die anhand einer Identifizierungstabelle zugeordnet werden konnten.

2.1.4 Synchronisation / Einstellung der Keimdichte der Laktobazillen

Die Einstellung der Keimdichte erfolgte mittels Trübungsvergleich unter Verwendung der Trübungsstandards nach McFarland. In einer Suspension bewirkt die Bakterienzahl eine Trübung, die von einem photoelektrischen Meßsystem registriert und ausgewertet werden kann. Diese Trübung wurde in einem Densitometer (Eppendorf, Hamburg, D) gemessen.

Die verwendeten Laktobazillen-Stämme wurden für die Versuche in Glasröhrchen mit Aqua dest. eingerieben und nach dem McFarland 0,5 Trübungsstandard eingestellt. Dies entspricht einer Bakteriendichte von $1,5 \times 10^8$ Keimen/ml.

2.1.5 Hitze inaktivierte Präparation von *L. rhamnosus*

Um den protektiven Einfluss von hitzeinaktivierten Laktobazillen zu untersuchen, wurde eine Probe des Stammes *L. rhamnosus*, welche zuvor in PBS auf eine Keimdichte nach McFarland 0,5 eingestellt worden war, 50 Minuten lang bei 90 °C im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, D) inkubiert. Zur Kontrolle wurden diese Zellen danach auf einer MRS-Agar-Platte aufgebracht, wobei in Kultur aufgrund der Vorbehandlung keine Lebendkolonien mehr entdeckt werden konnten.

2.1.6 Verwendung von D-Laktat

Um den protektiven Einfluss von Milchsäure (Laktat), einem von Laktobazillen gebildeten Stoffwechselprodukt, zu untersuchen, wurden 25 mg D-(-)-Laktat (Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) in 10 ml Aqua ad iniectabilia gelöst und auf eine Konzentration von 25 mM und einen pH von 3,5 eingestellt.

2.1.7 Verwendeter *C. albicans*-Stamm

Für die Wildtyp-Infektion des rekonstruierten humanen Vaginalepithels (RHVE) wurde der *C. albicans* Stamm SC5314 (16) verwendet. Der *C. albicans*-Stamm SC5314 wurde vor seiner Verwendung synchronisiert. Dazu wurde der tiefgefrorene Stamm zuerst mit Hilfe einer Platinimpföse auf Kimmig-Agar (Merck, Darmstadt, D) überimpft und anschließend für 24 h bei 37 °C in einem Inkubator (Heraeus, Hanau, D) angezüchtet. Ein Teil der gewachsenen Kolonien wurde anschließend in 5 ml 0,9%iger steriler Natriumchlorid (NaCl)-Lösung suspendiert und 10 Minuten bei 1500 U/min (Zentrifuge Sigma 3-18K mit Rotor 11180, Sigma Aldrich, Taufkirchen, D) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang mit 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung zweimal wiederholt. Anschließend wurde der Rückstand in 5 ml destilliertem Wasser resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 2×10^5 Zellen/ml wurden daraufhin in autoklaviertes YPD-Medium (*Yeast-Extract-Peptone-Dextrose*, Hefeextrakt-Pepton-Glukose, Difco, Detroit, USA) eingimpft. Diese Suspension wurde für 24 h bei 25 °C und 150 U/min in einem Schüttelinkubator (HT, Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert. Am nächsten Tag wurde wiederum die Zellzahl bestimmt und diesmal eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml mit frischem YPD-Medium eingestellt. Diese Suspension wurde für 24 h bei 37 °C und 150 U/min inkubiert. Abschließend wurde die Mischung dreimal mit jeweils 10ml steriler Phosphat-gepufferter Kochsalz-Lösung (PBS, Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) gewaschen. Die Inokulumgröße wurde mit PBS auf 4×10^7 Zellen/ml eingestellt.

2.2 Ex-vivo Vaginalschleimhautmodell

Das humane Epithel für das *ex vivo*-Modell der vaginalen Candidose wurde von der Firma Skinethic (Nizza, F) geliefert. Es besteht aus A431-Zellen, die von einem humanen Epidermoid-Karzinom der Vulva stammen. Diese Zelllinie bildet durch *in vitro*-Kultivierung auf einem 0,5 cm² großen Polycarbonatfilter, der als Dermisersatz fungiert, ein mehrschichtiges Epithel ohne Stratum corneum, das der menschlichen Vaginalschleimhaut *in vivo* gleicht. Die Kultivierung dauert fünf Tage und findet in einem serum-, antibiotika- und antimykotikafreien MCDB 153 Spezialmedium (Clonetics, San Diego, USA) statt, das 5 µg/ml Insulin und 1,5 mM Kalziumkonzentration enthält. Die Dicke des Epithels beträgt am fünften Tag durchschnittlich 68 µm. Es wurden jeweils 24 gekühlte, 0,5 cm² große, sterile Epithelien in Alufolie verpackt geliefert. Zusätzlich wurde ein antibiotika- und antimykotikafreies Erhaltungsmedium mitgeliefert, das bei längeren Versuchen alle 24 h gewechselt werden muss. Die infizierten und nicht infizierten Gewebekulturen wurden jeweils in 1 ml Erhaltungsmedium verbracht und bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau, D) inkubiert.

2.3 Versuchsdesign

Die einzelnen RHVE-Inserts wurden in einer Laminar-Air-Flow-Box (Lamin Air, Heraeus, Hanau, D) jeweils mit 50 µl der entsprechenden Stammpräparation beimpft. Zusätzlich wurden Kontrollproben mit 50 µl PBS angesetzt. Die einzelnen Inserts wurden in 1 ml Erhaltungsmedium gestellt, das bei längeren Versuchen alle 24 h gewechselt werden musste. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator angezüchtet. Nach der jeweiligen Versuchszeit wurde die Schleimhaut mit einem Skalpell aus dem Insert entfernt und halbiert. Ein Teil wurde bis zur Aufbereitung für die Zytokinexpressionsstudien mittels RT-PCR in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Der andere Teil wurde in Karnovsky-Fixierung gegeben und für die histologischen Untersuchungen verwendet. Das Erhaltungsmedium wurde ebenfalls schockgefroren und bei -80 °C für spätere Zytokinbestimmungen oder LDH-Tests aufgehoben.

2.3.1 Infektion mit Laktobazillen-Stämmen

Das Epithel wurde mit jeweils $1,5 \times 10^8$ Zellen der verschiedenen Laktobazillus-Stämme in 50 µl PBS beimpft. Gleichzeitig wurden Kontrollproben mit 50 µl PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 12, 24 und 36 Stunden inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24 h gewechselt.

2.3.2 Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC 5314

Das Epithel wurde jeweils mit 4×10^7 *C. albicans* Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 µl PBS infiziert. Gleichzeitig wurden Kontrollproben mit 50 µl PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 12, 24 und 36 Stunden inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24 h gewechselt.

2.3.3 Gleichzeitige Infektion mit Laktobazillen und *C. albicans*

Das Epithel wurde jeweils mit $1,5 \times 10^8$ Zellen der verschiedenen Laktobazillus-Stämme in 50 µl PBS und mit 4×10^7 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 µl PBS beimpft. Kontrollen wurden mit 50 µl PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 12, 24 und 36 Stunden inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24 h gewechselt.

2.3.4 Zeitversetzte Infektion mit Laktobazillen und *C. albicans*

Das Epithel wurde jeweils mit $1,5 \times 10^8$ Zellen der verschiedenen Laktobazillus-Stämme in 50 µl PBS und mit 4×10^7 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 µl PBS beimpft. In je einer Probe wurde zuerst mit dem Laktobazillus-Stamm vorinkubiert und nach der Hälfte der Zeit (nach 6, 12 und 18 Stunden) wurde *C. albicans* Wildtyp SC5314 hinzu gegeben. In einer zweiten Probe wurde zuerst mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 vorinkubiert und nach der Hälfte der Zeit (nach 6, 12 und 18 Stunden) wurde jeweils ein Laktobazillus-Stamm hinzugegeben. Kontrollen wurden mit 50 µl PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 12, 24 und 36 Stunden inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24 h gewechselt.

2.3.5 Infektion mit D-Laktat

Das Epithel wurde mit jeweils 25 mM D-Milchsäure in 50 µl PBS beimpft. Gleichzeitig wurden Kontrollproben mit 50 µl PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 12, 24 und 36 Stunden inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24 h gewechselt.

2.3.6 Gleichzeitige Infektion mit D-Laktat und *C. albicans* Wildtyp SC5314

Das Epithel wurde jeweils mit 25 mM D-Milchsäure in 50 µl PBS und mit 4×10^7 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 µl PBS beimpft. Kontrollen wurden mit 50 µl PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 12, 24 und 36 Stunden inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24 h gewechselt.

2.3.7 Zeitversetzte Infektion mit D-Laktat und *C. albicans* Wildtyp SC5314

Das Epithel wurde jeweils mit 25 mM D-Milchsäure in 50 µl PBS und mit 4×10^7 *C. albicans*-Zellen des Wildtypstammes SC5314 in 50 µl PBS beimpft. In je einer Probe wurde zuerst mit der D-Milchsäure vorinkubiert und nach der Hälfte der Zeit (nach 6, 12 und 18 Stunden) wurde *C. albicans* Wildtyp SC5314 hinzu gegeben. In einer zweiten Probe wurde zuerst mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 vorinkubiert und nach der Hälfte der Zeit (nach 6, 12 und 18 Stunden) wurde D-Laktat hinzugegeben. Kontrollen wurden mit 50 µl PBS angesetzt. Die Proben wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit für 12, 24 und 36 Stunden inkubiert. Das Erhaltungsmedium wurde nach 24 h gewechselt

2.4 Lichtmikroskopie

2.4.1 Fixierung und Einbettung

Für die histologischen Untersuchungen wurde das Epithel im Anschluss an die Infektion fixiert. Zunächst wurden die Proben für mindestens fünf Stunden bei 4 °C in eine nach Karnovsky modifizierte Lösung gelegt. Diese besteht aus 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung (Serva, Heidelberg, D) und 2,0%iger Formaldehyd-Lösung (Merck, Darmstadt, D) in 0,1 M Phosphatpuffer (Merck) mit einem pH-Wert von 7,3 (28). Im Anschluß wurde die Lösung bei Raumtemperatur abpipettiert und dreimal mit 0,1 M Phosphatpuffer für jeweils 15 Minuten gespült. Die Nachfixierung des Epithels erfolgte eine Stunde lang bei Raumtemperatur mit 1% Osmiumtetroxid (OsO₄, Serva)-Lösung in 0,1 M Phosphatpuffer. Danach wurde die Haut noch zweimal für jeweils 15 Minuten mit 0,1 M Phosphatpuffer gespült. Die anschließende Entwässerung der Proben erfolgte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, bestehend aus 35-, 50-, 70- und 90%igem sowie absolutem Ethanol (Apotheke der Innenstadtkliniken der LMU, München, D). Für die folgende Glycidethereinbettung nach Luft (32) musste zunächst eine flüssige Kunstharzlösung hergestellt werden. Diese setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Komponente A enthält 62 ml Glycidether (Serva) und 100 ml Dodecanylbarnsteinsäureanhydrid (Serva). Komponente B setzt sich aus einer Mischung von 100 ml Glycidether (Serva) und 89 ml Methyl-

nadicanhydrid (Serva) zusammen. Die Mischung der beiden Komponenten A und B erfolgte im Verhältnis 2:3. Abschließend wurde noch der Polymerisationsbeschleuniger p-Dimethylaminomethylphenol (Serva) in 1,5%iger Konzentration zugesetzt. Zunächst wurden die Proben 60 Minuten in eine Mischung des oben beschriebenen Kunstharzes und absoluten Ethanol im Verhältnis 1:1 gegeben. Anschließend wurden das Kunstharz und das absolute Ethanol im Verhältnis 2:1 gemischt und die Proben zwei Stunden in diese Mischung gelegt. Danach legte man die Proben in die reine Kunstharzmischung. Nach drei Stunden erneuerte man diese Kunstharzmischung und ließ die Proben über Nacht im Kühlschrank stehen. Am nächsten Tag wurden die in der Kunstharzmischung liegenden Schleimhautproben für eine Stunde auf 37 °C erwärmt, um den restlichen Alkohol aus den Proben zu entfernen. Anschließend erfolgte das Zerschneiden des Epithels. Unter der Lupe wurde das Epithel mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten und in Einbettungsformen gelegt, die mit flüssiger Kunstharzmischung gefüllt waren. Diese wurden dann zur Aushärtung des Harzes für mindestens 10 Tage bei 60 °C im Trockenschrank (WTB Binder, Tuttlingen, D) aufbewahrt. Nach erfolgter Aushärtung konnten die einzelnen Kunstharzblöcke auf die optimale Größe getrimmt werden (Ultratrimm, Reichert, Wien, A).

2.4.2 Semidünnschnitt und lichtmikroskopische Untersuchung

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden zunächst von den getrimmten Kunstharzblöcken mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Ultracut, Reichert, Wien, A) Semidünnschnitte mit einer Dicke von 1 µm angefertigt. Die anschließende Färbung erfolgte mittels einer hergestellten Mischung aus 1%iger Pyronin G Lösung (Merck) und 1%igem Toluidinblau (Merck), gepuffert mit 1% Dinatriumtetraborat (Borax, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), im Verhältnis 1:4 für fünf Minuten bei 60 °C auf einer Heizplatte (Medax, München, D). Die gefärbten Schnitte wurden bei 60 °C getrocknet und anschließend mit einem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, D) bei 400facher Vergrößerung ausgewertet.

2.5 RT-PCR

2.5.1 Gesamt-RNA-Extraktion

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden die bei -80 °C schockgefrorenen Proben mit 1 ml peqGOLD RNAPure (peqLab, Erlangen, D) versetzt. Diese Lösung enthält Phenol und Guanidinisothiozyanat in einphasiger Lösung. Die Proben wurden zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und mussten danach für weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 12000 U/Min (He-

raeus Biofuge fresco mit Rotor 3324, Heraeus, Osterode, D) bei 20 °C erfolgte die Auftrennung der Probe in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA lagert sich ausschließlich in der oberen wässrigen Phase an, DNA und Proteine befinden sich dagegen in der Interphase und der Phenol-Chloroform-Phase.

Die wässrige Phase mit der enthaltenen RNA wurde abpipettiert, in ein neues Gefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) und 10 µl Glykogen (Sigma) versetzt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 10 Minuten bei 12000 U/Min (Heraeus Biofuge fresco mit Rotor 3324) in der Kältezentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Dies führte zur Ausfällung der gelartigen RNA am unteren Ende des Röhrchens. Der Isopropanol-Überstand wurde verworfen und die RNA zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Ethanol-Überstandes wurde das im Röhrchen enthaltene RNA-Pellett leicht getrocknet und danach in 1 µl RNase-Inhibitor (Invitrogen, Karlsruhe, D) und 7 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (Sigma) gelöst. RNase-Inhibitor und DEPC verhindern die Kontamination mit RNasen. Dies sind Enzyme, die RNA zersetzen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.2 Photometrische Messung

Der RNA-Gehalt wurde mit einem Photometer (Bio Photometer, Eppendorf, D) gemessen. Zuerst erfolgte ein Nullabgleich gegen DEPC-Wasser mit RNase-Inhibitor. Zur eigentlichen Messung wurde 1 µl RNA-Lösung in eine Kunststoffküvette (Uvette, Eppendorf, D) gegeben und die Probe bei 260 nm und 280 nm vermessen. Durch die Messung der Absorption bei 260 nm kann direkt der Gehalt an Gesamt-RNA ausgerechnet werden, indem man folgende Formel verwendet:

$$A_{260\text{nm}} \times 100 \times 40 = \text{Konz. } [\mu\text{g/ml}]$$

Durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm kann man untersuchen, ob die RNA mit Proteinen, Guanidinisothiocyanat oder Phenol kontaminiert ist, welche die RT-Reaktion stören würden. Für eine optimale RNA-Isolierung sollte das Verhältnis im Bereich von 1,6 bis 1,8 liegen (Arbeitsanleitung peqlab). Ansonsten sollte ein weiterer Waschvorgang mit Ethanol durchgeführt werden. Für die RT-Reaktion wurden immer 2 µg Gesamt-RNA verwendet.

2.5.3 DNase-Verdau und reverse Transkriptase

Zu 2 µg Gesamt-RNA wurden 1 µl DNase I (Invitrogen), 1 µl DNase Puffer (Invitrogen) und 7 µl DEPC-Wasser hinzu gegeben, um die eventuell noch vorhandene DNA zu zersetzen. Die Mischung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 µl 25 mM EDTA-Lösung versetzt, um überschüssige Metallionen zu binden. Durch 10 Minuten andauerndes Erwärmen des Gemischs auf 65 °C wurde die DNase I inaktiviert. Anschließend wurde die Mischung für mindestens 1 Minute bei -4 °C auf Eis gekühlt. Die eigentliche RT-Reaktion erfolgte mittels der Reagenzien aus dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, D) nach Anleitung. Bei dieser Methode synthetisiert die enthaltene Avian-Myeloblastosis-Virus (AMV) Reverse Transkriptase die neue Strang-cDNA an den Stellen, an denen der ebenfalls in diesem Kit enthaltene und der RNA zugeführte Primer bindet. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte bei 42 °C über 60 Minuten. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 99°C für eine Minute beendet. Das entstandene cDNA-Gemisch konnte direkt für die PCR verwendet werden. Als Kontrolle, dass bei Umwandlung von mRNA in cDNA nicht bereits DNA vorhanden war, wurde einer Kontroll-RNA anstelle von AMV Reverse Transkriptase DEPC-Wasser zugegeben. Eine Umwandlung von mRNA in cDNA sollte in diesem Fall nicht stattfinden. Bei der anschließenden PCR sollte bei dieser Probe im Idealfall keine Anlagerung von DNA-Primern erfolgen.

2.5.4 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methodik der PCR, die 1985 von Kay Mullis (37) entwickelt worden war, ermöglicht aufgrund ihrer hohen Sensitivität bereits aus einer sehr kleinen Anzahl von Zellen einen positiven Nachweis von DNA.

Die PCR verläuft in drei Phasen (siehe Abbildung 1):

1. Denaturierung: Beim Erhitzen auf eine Temperatur von 95°C wird die Ziel-DNA in Einzelstränge getrennt. Alle sonstigen Enzymreaktionen werden durch das Erhitzen gestoppt.

2. Anbindung (annealing): Im zweiten Schritt erfolgt beim Abkühlen auf die sogenannte annealing-Temperatur (im Bereich zwischen 45 °C bis 65 °C) die Hybridisierung der zugefügten einzelsträngigen Primer mit den komplementären Enden des zu vervielfältigenden templates. Die Primer binden sich an die Einzelstrang-DNA. An diese kleinen Stücke von Doppelstrang-DNA kann sich die hitzestabile Taq-Polymerase binden und die Vorlage kopieren. Schon nach dem Anbau weniger Basen sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Vorlage und dem Primer so fest, dass sie nicht mehr aufgebrochen werden können.

3. Verlängerung: Im dritten Schritt verlängert die hitzestabile DNA-Polymerase unter den vorgegebenen Reaktionsbedingungen (72 °C) und in Gegenwart von Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang des templates.

Primer, die nicht optimal an die DNA gebunden sind, d.h. nicht exakt komplementär sind, werden durch das Erwärmen wieder abgelöst. Es werden also nur die gesuchten DNA-Abschnitte kopiert.

Diese 3 Schritte bilden einen PCR-Zyklus, wobei bei einer klassischen PCR diese Schritte 30-60 mal wiederholt werden. Am Ende der PCR entstehen maximal 2^n doppelsträngige DNA-Moleküle, die Kopien der ursprünglichen Zielregion zwischen den Primern darstellen.

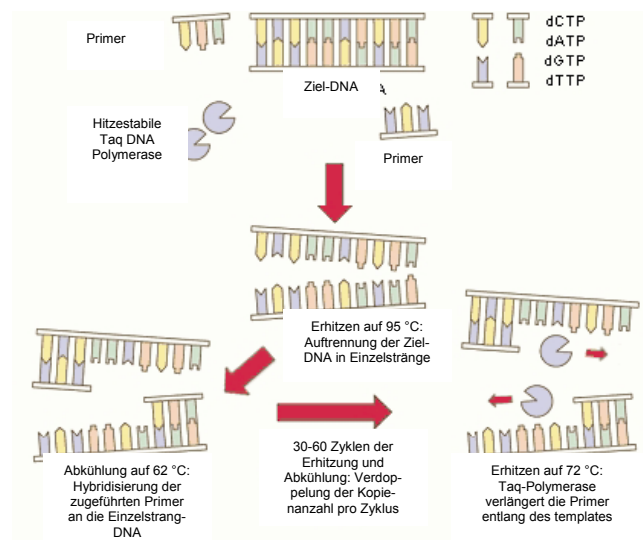


Abbildung 1: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus (48)

2.5.5 Quantitative PCR-Analyse und verwendete Primer

Die Echtzeit-PCR (real-time-PCR) mit der LightCycler-Technologie (Roche, Mannheim, D) ist zurzeit eine der exaktesten Methoden zum quantitativen Nachweis von Genexpression in einem einzigen Reaktionsansatz. Die Amplifikation erfolgt mit der in der PCR üblicherweise verwendeten hitzestabilen DNA-Polymerase. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green), der sich in die minor groove (kleine Furche) von doppelsträngiger DNA einlagert, wird die Amplifikation mit der quantitativen Detektion unmittelbar kombiniert. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Ausgangsintensität um ein Vielfaches verstärkt. Die Intensität des entstandenen Signals ist direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge. Bei der LightCycler-Technologie wird diese emittierte Fluoreszenz nach jedem Zyklus (Verdoppelung der Menge an doppelsträngiger DNA) gemessen. Die Fluoreszenz wird schließlich nach einer bestimmten Zahl an Zyklen, die abhängig ist von der Zahl der Ausgangskopien, messbar.

Der LightCycler besteht aus einer zylindrischen Kammer, die mit Luft geheizt wird (siehe Abbildung 2). Als Reaktionsgefäße werden dünne Glaskapillaren mit einem Volumen von 20 µl verwendet. Die eigentliche Detektionseinheit ist auf dem Boden der Reaktionskammer angebracht. Sie besteht aus einer blauen LED (470 nm) und Photozellen, die in den Kanälen F1, F2 und F3 messen (F1 = grün = 515 nm; F2 = rot = 640 nm; F3 = tiefrot = 705 nm). Die Proben werden nacheinander über die Detektionseinheit gefahren und gemessen. Im LightCycler werden die Fluorophore mit einer Blau-Licht emittierenden Diode (470 nm) beleuchtet. Die gelb-grünen Fluorophore des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green werden dadurch spezifisch angeregt und die resultierende Emissions-Fluoreszenz wird dann gemessen.

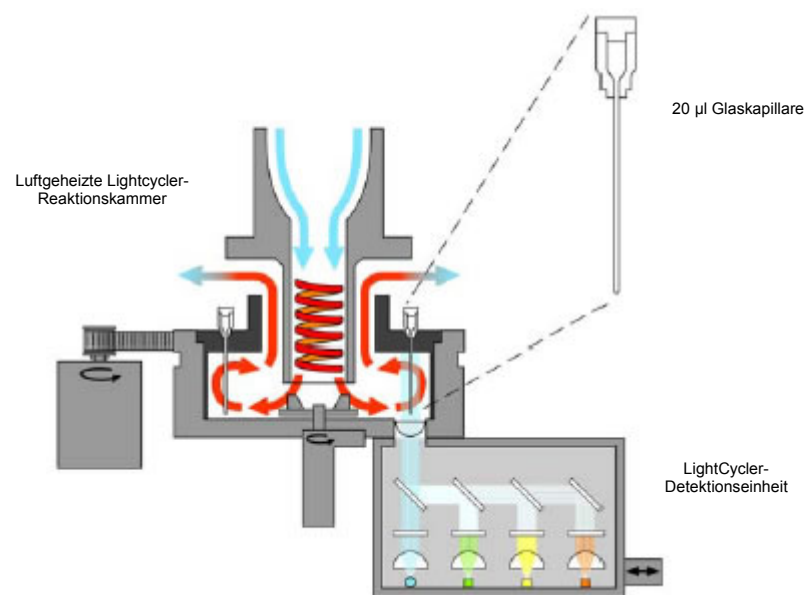


Abbildung 2: schematische Darstellung des LightCycler-Messinstruments (49)

Für die Messung im LightCycler wurde zu je 1 µl der vorher umgewandelten cDNA-Probe (template) jeweils 1 µl eines Primerpaares (Primerkonzentration 10 pmol), 6 µl H₂O sowie 2 µl des Reaktionsmixes (LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, bestehend aus FastStart Taq DNA Polymerase, Pufferlösung, MgCl₂, SYBR Green Fluoreszenzfarbstoff sowie dNTP-Mix) pipettiert.

Die verwendeten Primer wurden im Rahmen mehrjähriger Forschung im Labor etabliert. Wesentlich für die Exaktheit und Effizienz der PCR-Analyse ist die Optimierung der Primer. Jedes Primerpaar wurde deshalb mit mehreren unterschiedlichen Verdünnungsstufen genspezifischer DNA getestet. Diese Verdünnungsstufen dienen bei zukünftigen Messungen als Grundlage für externe Standardkurven. Jedem LightCycler-Ansatz wird eine Probe einer bekannten Verdünnungsstufe beigelegt. Um die exakte Kopienzahl der Proben bestimmen zu können, wird das Ergebnis der bekannten Verdünnung

mit dem der externen Standardkurve abgeglichen. Die exakte Kopienanzahl der unbekannten templates kann somit bestimmt werden.

Da sich SYBR Green auch an unspezifische Amplifikationsprodukte anlagert, werden bei jedem LightCycler-Lauf Schmelzkurven erstellt und die Schmelzpunkte bestimmt. Der Schmelzpunkt ist die Temperatur, bei der die Hälfte der komplementären Sequenzen hybridisiert vorliegt. Der Schmelzpunkt wurde beim Primerdesign für jedes Primerpaar berechnet und soll mit der bestimmten Schmelzpunkttemperatur bei korrektem Amplifikationspunkt übereinstimmen. Unspezifische Amplifikationsprodukte oder Primerdimere können aufgrund abweichender Schmelzpunkte identifiziert werden.

Zur genauen Berechnung der Template-Konzentration eines Ziel-Gens muss außerdem die Amplifikationseffizienz der Reaktion bekannt sein. Theoretisch liegt die optimale Effizienz einer PCR-Reaktion bei zwei, das entspräche einer vollständigen Replikation des templates pro Zyklus. Die Amplifikationseffizienz E lässt sich mit der Formel $E = 10^{-1/\text{slope}}$ bestimmen. Die Effizienz lag in allen Amplifikationen bei über 1,80. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Primer mit den jeweiligen Primersequenzen:

Primername Primerlänge	Primersequenz 5' – 3'
GAPDH 637bp	Fwd 5' - GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC C – 3' Bwd 5' - GTC TGA GTG TGG CAG GGA CTC – 3'
TNF-alpha 287bp	Fwd 5' - GGG ACC TCT CTC TAA TCA GCC CTC TGG – 3' Bwd 5' - GAC GGC GAT GCG GCT GAT GG – 3'
GM-CSF 396bp	Fwd 5' - GTG GCC TGC AGC ATC TCT GCA C – 3' Bwd 5' - CCT GGA CTG GCT CCC AGC AGT C – 3'
IL-1alpha 631bp	Fwd 5' - CAC TCC ATG AAG GCT GCA TGG – 3' Bwd 5' - ACC CAG TAG TCT TGC TTT GTG G – 3'
IL-1beta 431bp	Fwd 5' - GCA TCA CTG AAC TGC ACG CTC CG – 3' Bwd 5' - GGT GAA GTC AGT TAT ATC CTG GCC G – 3'
IL-6 355bp	Fwd 5' - CAT CCT CGA CGG CAT CTC AGC – 3' Bwd 5' - CGT CAG CAG GCT GGC ATT TG – 3'
IL-8 365bp	Fwd 5' - GCA GCT CTG TGT GAA GGT GCA G – 3' Bwd 5' - GCA TCT GGC AAC CCT ACA ACA G – 3'
IL-10 138bp	Fwd 5' - GTG ATG CCC CAA GCT GAG A – 3' Bwd 5' - CAC GGC CTT GCT CTT GTT TT – 3'
IFN-gamma 120bp	Fwd 5' - TCA GCT CTG CAT CGT TTT GG – 3' Bwd 5' - GTT CCA TTA TCC GCT ACA TCT GAA – 3'

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer

2.5.6 Housekeeping-Gene und relative Quantifizierung

Innerhalb der Real-time-PCR gibt es unterschiedliche Strategien für die Quantifizierung:

1. Die *absolute Quantifizierung*, bei der anhand einer externen Kalibrierkurve die Expression des Ziel-Gens quantifiziert wird. Die externe Kalibrierkurve enthält hierbei verschieden verdünnte Proben mit bekannter Konzentration.
2. Die *relative Quantifizierung*, bei der die Expression des Ziel-Gens (Target-Gen) mit der eines stabil exprimierten Referenzgens (sog. Housekeeping Gen) verglichen wird.

Housekeeping-Gene kodieren Proteine, die für die Aufrechterhaltung von Zellfunktionen essentiell sind. Es handelt sich somit um (idealerweise) konstant exprimierte Gene, die sich selbst in geringen cDNA-Konzentrationen nachweisen lassen. Diese werden zum Vergleich herangezogen, wenn die Gen-Expression anderer Gene untersucht werden soll.

Da Housekeeping-Gene nicht in allen Zell-Typen konstant exprimiert werden, ist es notwendig, die verwendeten Proben auf mehrere Housekeeping-Gene zu untersuchen, um eines zu finden, welches am wenigsten und somit am konstantesten reguliert wird (68). In der vorliegenden Arbeit erwies sich GAPDH als konstantestes Housekeeping-Gen.

Aus dem Quotient der im LightCycler gemessenen Konzentrationen von Target- und Housekeeping-Gen ergibt sich ein Verhältnis, welches zeigt, um wie viel stärker oder schwächer das Ziel-Gen in der jeweiligen Probe exprimiert wird. Es gilt somit:

$$\text{Relative Konzentration} = \text{Ziel-Gen-Konzentration} / \text{Housekeeping-Gen-Konzentration}$$

2.5.7 Crossing Point

Der Crossing-Point (CP) beschreibt den Punkt im PCR-Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über eine ständig vorhandene Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Der CP dient somit als interne Kontrolle, ob ein Gen wirklich exprimiert wird. Je früher der CP erreicht wird, umso stärker wird ein Gen exprimiert. Liegt der CP der untersuchten Probe näher am CP der Negativ-Kontrolle und somit am Ende eines PCR-Zyklus, geschieht dies zu einem Zeitpunkt, an dem häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren. Zu diesem späten Zeitpunkt der PCR sind Substrate annähernd verbraucht, Polymerasen und Nucleotide werden durch Hitze langsam inaktiviert.

2.6 LDH-Messung

Die Laktatdehydrogenase ist ein Enzym, das die Reduktion von Pyruvat zu Laktat bei der Glykolyse katalysiert. NADH fungiert hierbei als Coenzym. LDH ist aus vier Polypeptidketten aufgebaut. Es existieren fünf Isoenzyme, deren Verteilung für verschiedene Organe charakteristisch ist. Kommt es zu einer Schädigung der Zellen, wie zum Beispiel beim Herzinfarkt, so erhöht sich der LDH-Spiegel im Serum. Werden die Zellen der Vaginalschleimhaut geschädigt, kommt es ebenfalls zu einer Erhöhung der LDH-Konzentration im Erhaltungsmedium. Über eine photometrische Messung der NADH-Abnahme bei 340 nm kann diese Konzentration nach der Wróblewski-La Due-Methode (71) bestimmt werden. Alle Erhaltungsmedien wurden nach der Infektion des RHVE mit den verschiedenen Laktobazillus-Spezies, dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 oder nur mit PBS (Kontrolle) nach den verschiedenen Infektionszeiten (12, 24 und 36 Stunden) auf ihre LDH-Konzentration hin untersucht. Die Reaktion von Laktat zu Pyruvat bei der Glykolyse erfolgt nach folgender Reaktionsgleichung:



3 Ergebnisse

3.1 Laktobazillen-Spezies-Klassifizierung

Aus den verwendeten probiotischen Produkten und dem Vaginal-Abstrich konnten unter anaeroben Bedingungen Bakterien angezüchtet werden. Mittels des API 50 CH Systems (bioMérieux) konnten die isolierten Stämme identifiziert werden. Tabelle 5 zeigt das Ergebnis der Identifizierung:

Produkt	Lt. Hersteller enthaltener Stamm	Mittels API 50 CH Identizierter Stamm
LC1, Nestlé	<i>L. johnsonii LA1</i>	<i>L. acidophilus 1</i>
Actimel, Danone	<i>L. casei defensis</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei 1</i> bzw. <i>2</i>
Yakult, Yakult	<i>L. casei shirota</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei 1</i> bzw. <i>2</i>
LGG, Infectopharm	<i>L. rhamnosus GG</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Wildtyp A		<i>L. acidophilus 2</i>

Tabelle 5: Ergebnis der Laktobazillen-Identifizierung durch das API 50 CH System

Das API 50 CHL System ist nur zur Identifizierung der in der Datenbasis enthaltenen Spezies bestimmt, die Zugehörigkeit wird anhand einer Prozenttabelle am Ende der beigefügten Arbeitsanleitung bestimmt. Bei den Keimen in den getesteten Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmitteln handelt es sich um im Labor gezüchtete und vom Hersteller geschützte Laktobazillen, die in der Datenbasis nicht vorhanden sind. Die bei LC1, Actimel und Yakult identifizierten Stämme wurden allerdings auch bei Kwon et al. (30) in dieser Art und Weise mittels API 50 CH identifiziert. Da bei der Anzüchtung der Laktobazillen auf MRS-Agar keine weiteren Stämme oder andere Verunreinigungen gewachsen waren, kann von der Authentizität der verwendeten Stämme ausgegangen werden.

3.2 Ex-vivo-Untersuchungen zur Bedeutung von Laktobazillen bei der vaginalen Kandidose

Grundsätzlich zeigte sich bei der histologischen Untersuchung kein Unterschied bei der protektiven Wirkung der einzelnen Laktobazillen-Stämme auf die Infektion mit *C. albicans*. Daher wird bei der nachfolgenden Beurteilung der Morphologie des RHVE beispielhaft das Bild in Anwesenheit eines Laktobazillen-Stammes stellvertretend für die jeweilige Testsituation gezeigt.

3.2.1 Morphologie des nicht-infizierten RHVE

Das RHVE besteht aus 6-8 Zellschichten mit einer Gesamtdicke von 68 μm ohne Stratum corneum. Je nach Dauer der Inkubation mit PBS kommt es zu einer Dickenzunahme um 1-2 Keratinozytenzellschichten. Alle Zellen, auch die der obersten Zellschicht, enthalten Kerne. Über den gesamten Zeitraum (12, 24 und 36 Stunden) zeigte sich eine regelrechte Morphologie ohne Anzeichen von Ödem oder Nekrose (Abbildungen 3 – 5).

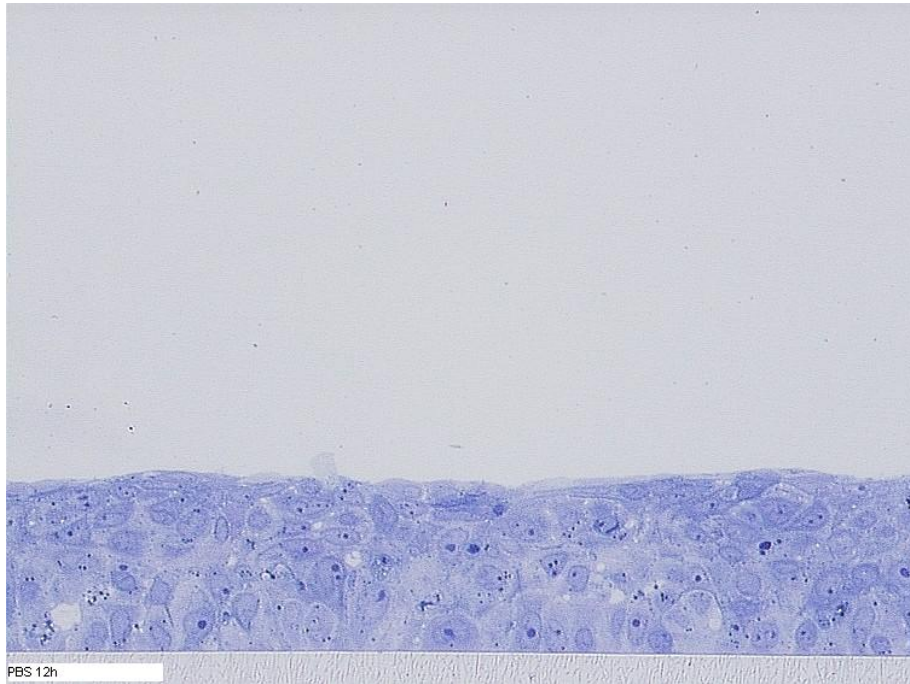


Abbildung 3: 12 Stunden altes, nicht infiziertes rekonstruiertes humanes Vaginalepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

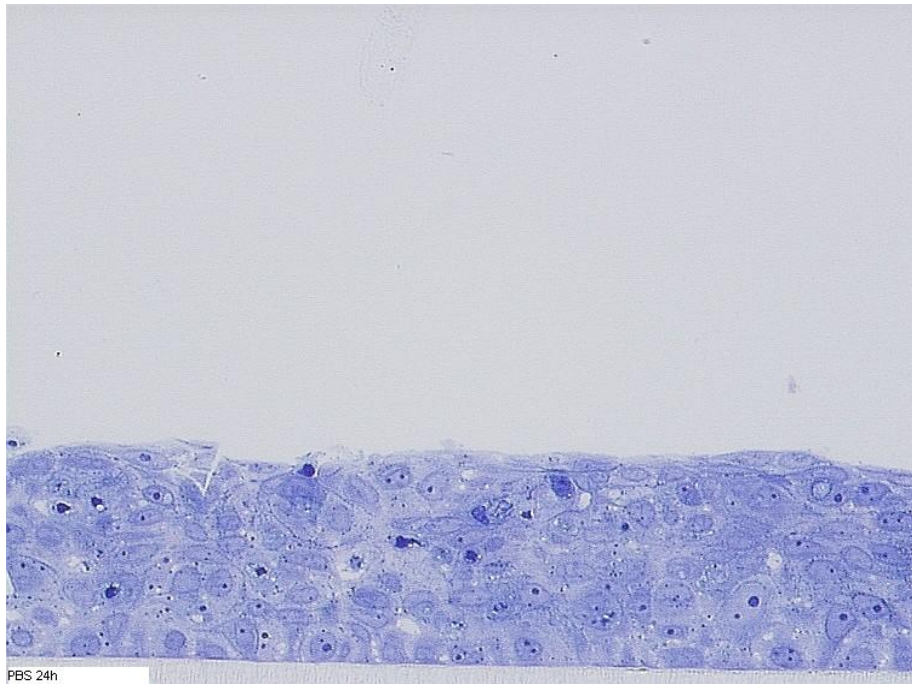


Abbildung 4: 24 Stunden altes, nicht infiziertes rekonstruiertes humanes Vaginalepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

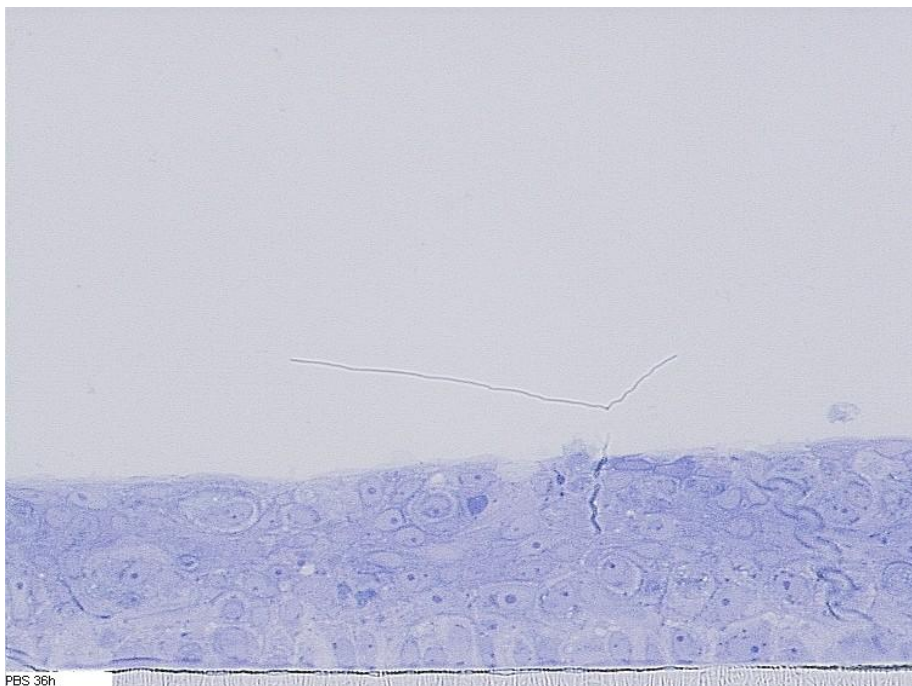


Abbildung 5: 36 Stunden altes, nicht infiziertes rekonstruiertes humanes Vaginalepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

3.2.2 Morphologie des RHVE nach Infektion mit Laktobazillen

Auch beim mit Laktobazillen beimpften rekonstruierten humanen Vaginalepithel zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum von 12, 24 und 36 Stunden eine regelrechte Morphologie ohne Anzeichen von Ödem und Nekrose (Abbildungen 6-8). In allen Zellschichten (6-8 Schichten), auch in denen der obersten Zellschicht, sind Kerne enthalten. Auch im Vergleich der verschiedenen Laktobazillen-Stämme zeigte sich kein Unterschied.

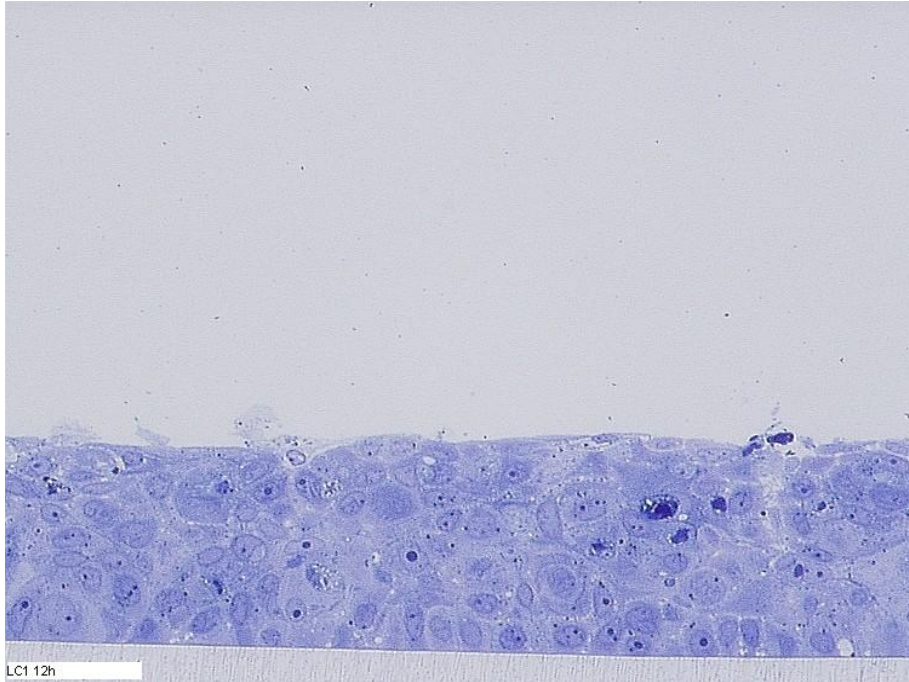


Abbildung 6: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 12h nach Infektion mit *L. johnsonii* LA1, bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

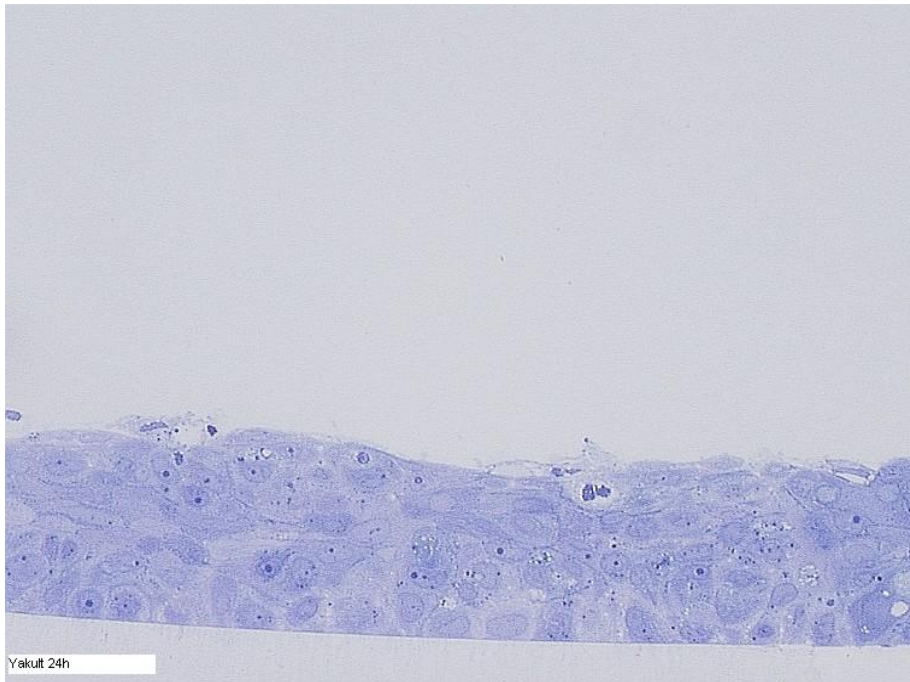


Abbildung 7: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit *L. casei shirota*, bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht;
Original-Vergrößerung x 400

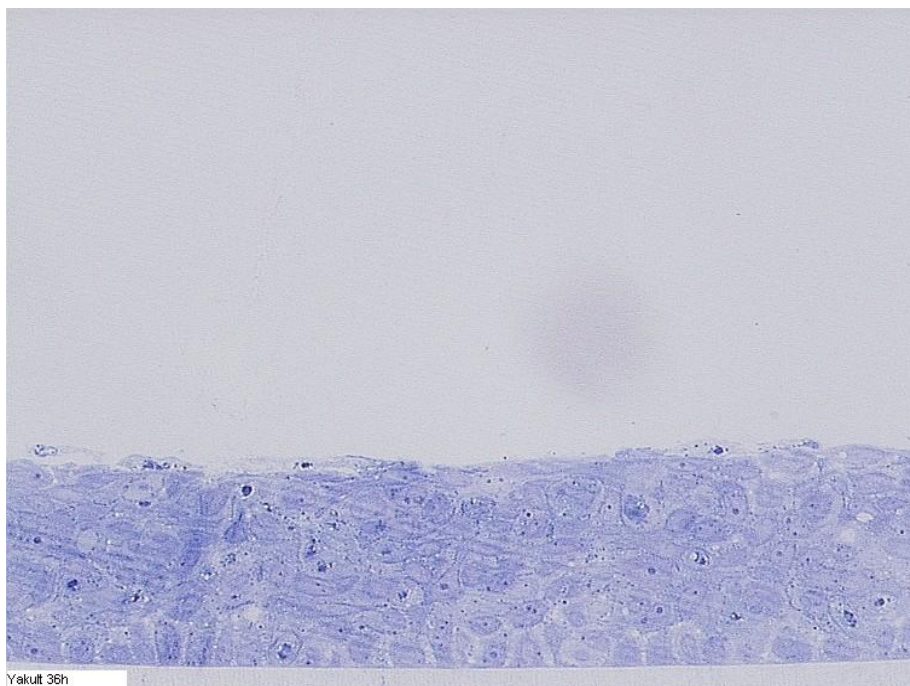


Abbildung 8: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 36 nach Infektion mit *L. casei shirota*, bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht;
Original-Vergrößerung x 400

3.2.3 Morphologie des RHVE nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314

Bei den mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten rekonstruierten humanen Vaginalepithelien kam es bereits nach 12 Stunden zu einer leichten sichtbaren Schädigung des Epithels mit Bildung von inter- und intrazellulären Ödemen (Vakuolen). Vereinzelt lösten sich oberflächlich gelegene Zellen aus dem Zellverband. An der obersten Zellschicht lagerten sich Pilze in einem lockeren Zellverbund an, ohne die Oberfläche zu penetrieren (Abbildung 9).

Nach 24 Stunden zeigte sich eine bereits deutlich sichtbare Schädigung des Vaginalepithels. Das Herauslösen von Keratinozyten aus dem Zellverband, starke ödematöse Schwellungen der Keratinozyten bis in tiefe Zellschichten bestimmte das histologische Bild nach 24 Stunden. Ein dichter Pilzrasen lag dem Epithel auf, Pilzzellen drangen in das RHVE ein (Abbildung 10).

Nach 36 Stunden ist das RHVE vollständig zerstört, Pilze drangen tief in die Basalzellschicht bzw. weiter bis zur Polycarbonatträgerschicht durch (Abbildung 11).



Abbildung 9: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 12 h nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Sichtbare Bildung von inter- und intrazellulären Ödemen in den oberen Zellschichten, beginnende Adhäsion von Hefezellen an der Schleimhautoberfläche. Original-Vergrößerung x 400

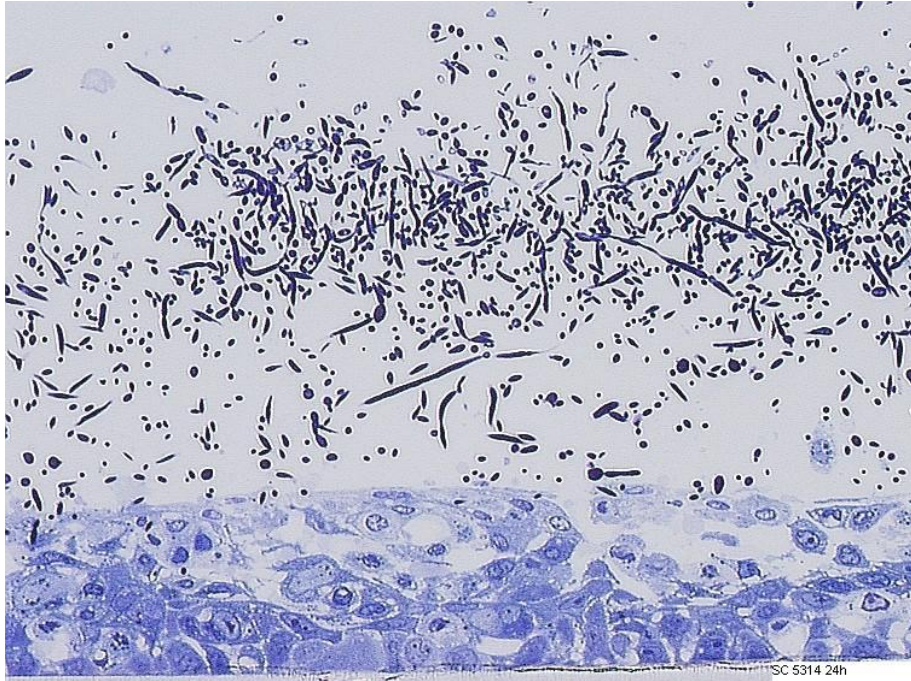


Abbildung 10: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 24 h nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Herauslösen von Zellen aus den oberen Zellschichten des Epithels, ödematöse Schwellung bis in tiefe Zellschichten mit deutlicher Adhäsion von Hefezellen an der Schleimhautoberfläche. Original-Vergrößerung x 400

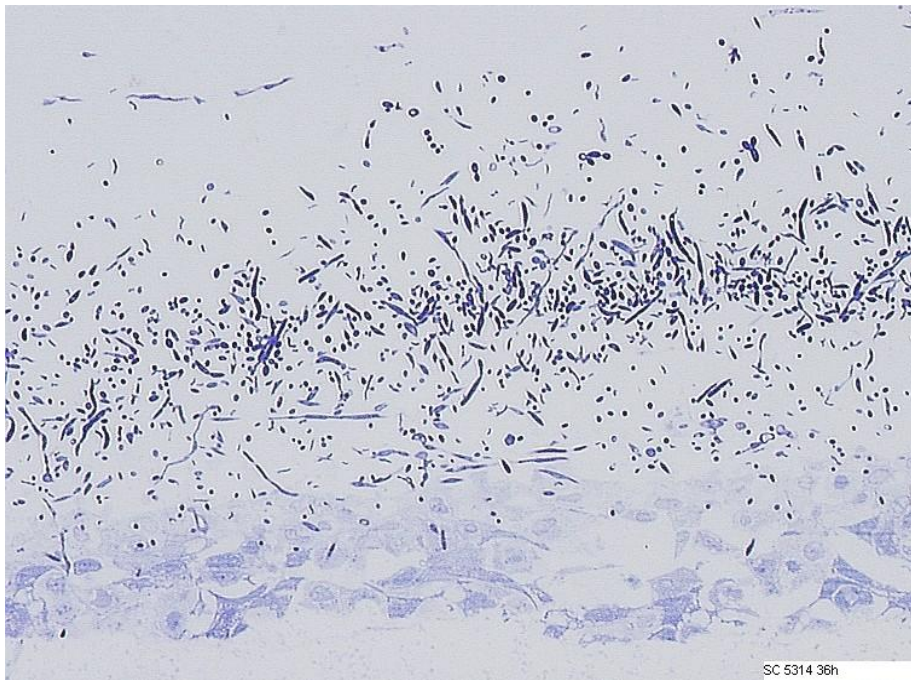


Abbildung 11: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 36h nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Zerfall des Epithels, Pilzzellen sind bis zur Basalzellschicht durchgedrungen. Original-Vergrößerung x 400

3.2.4 Morphologie des RHVE nach Infektion mit Laktobazillen und *C. albicans* Wildtyp SC5314

Beim gleichzeitigen Beimpfen des rekonstruierten humanen Vaginalepithels mit Laktobazillen und *C. albicans* Wildtyp SC5314 zeigte sich folgendes Bild:

Nach 12 Stunden zeigte sich eine beginnende Ödem- bzw. Vakuolenbildung, allerdings lösten sich vorerst keine Zellen aus dem Epithel heraus. Oberflächlich lagerten sich vereinzelt Pilze an, ohne jedoch in die Oberfläche zu penetrieren. Im Vergleich zu dem alleine mit Laktobazillen beimpften Epithel war der Zellschaden insgesamt ausgeprägter. Der Vergleich mit dem alleine mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierten RHVE zeigt jedoch durchweg einen deutlich geringeren Schaden mit geringerer Vakuolen- bzw. Ödembildung. Zusätzlich lagern sich deutlich weniger Pilze an (Abbildung 12).

Nach 24 Stunden kommt es zu einer Zunahme und Verdichtung der dem Epithel aufliegenden Pilzzellen, eine Tiefenpenetration findet allerdings weiterhin nicht statt. Allerdings kommt es verstärkt zu einer Ödembildung im Epithel, von der auch basal gelegene Zellen betroffen sind (Abbildung 13).

Im längsten Untersuchungszeitraum von 36 Stunden ist es im RHVE zu einer deutlich sichtbaren Vakuolenbildung gekommen, die Keratinozyten sind deutlich ödematös geschwollen. Der Zellverbund des Epithels ist allerdings noch nicht aufgelöst, das RHVE ist noch mit der Polycarbonaträgerschicht verbunden. Wenngleich auch eine deutlich sichtbare Menge an *C. albicans* Wildtyp SC5314 aufliegt, kommt es zu keinem Eindringen von Hefezellen in das Epithel (Abbildung 14).

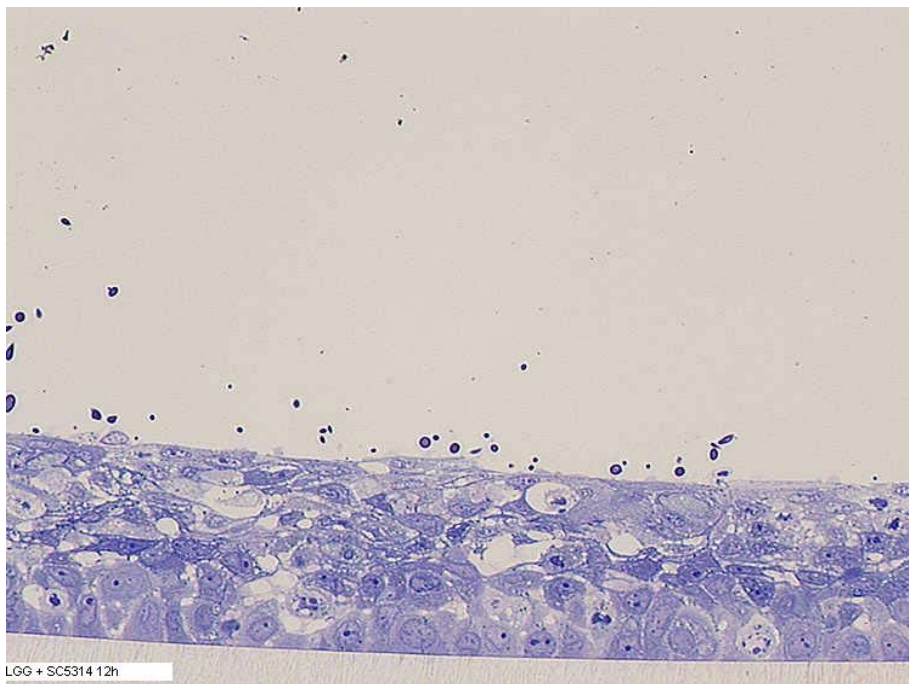
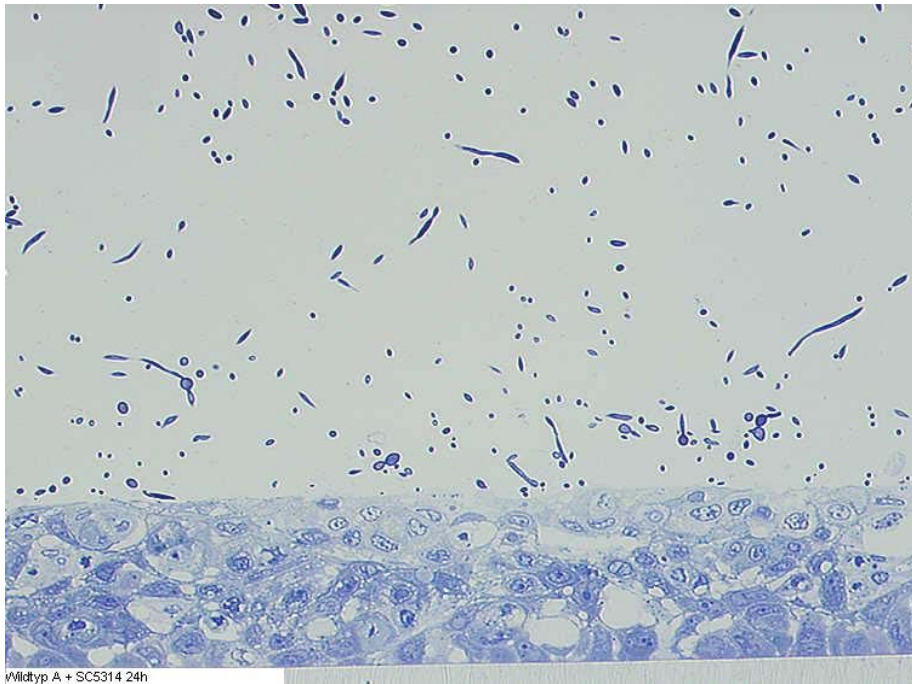


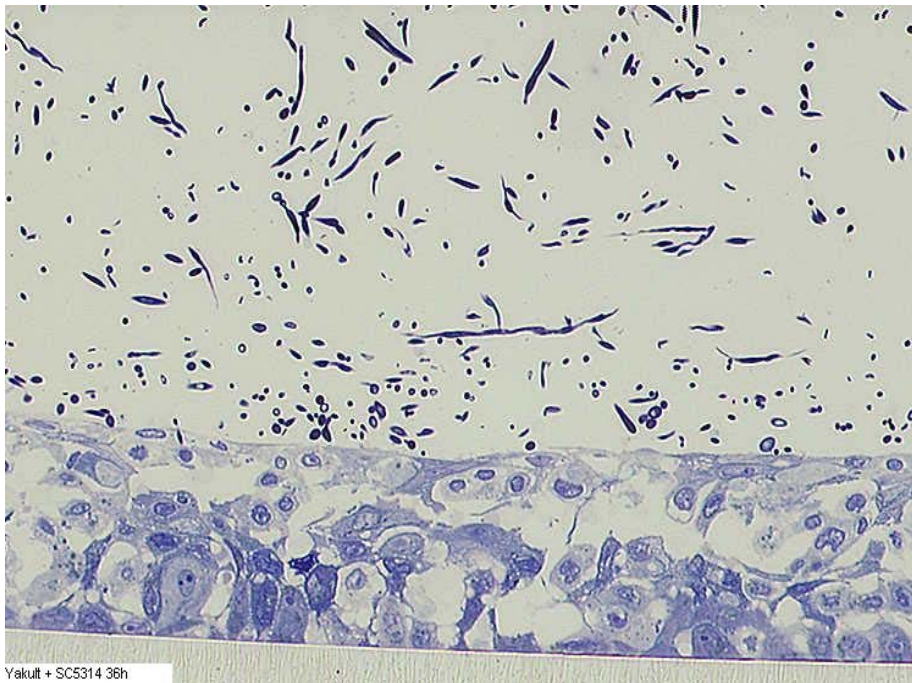
Abbildung 12: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 12 h nach Infektion mit *L. rhamnosus* GG und *C. albicans* Wildtyp SC5314. Beginnende Vakuolen- bzw. Ödembildung im Epithel mit oberflächlicher Anlagerung von Hefezellen ohne Eindringen in das Epithel.

Original-Vergrößerung x 400



Wildtyp A + SC5314 24h

Abbildung 13: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 24 h nach Infektion mit *L. acidophilus* und *C. albicans* Wildtyp SC5314. Deutlich verstärkte Vakuolenbildung, auch der basal gelegenen Zellen, vermehrte oberflächliche Anlagerung von Hefezellen, weiterhin ohne Eindringen in das Epithel. Original-Vergrößerung x 400



Yakult + SC5314 36h

Abbildung 14: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 36 h nach Infektion mit *L. casei shirota* und *C. albicans* Wildtyp SC5314. Großvolumige Vakuolenbildung bei erhaltenem Zellverbund. Eine Besiedelung des RHVE durch Pilzzellen hat weiterhin nicht stattgefunden. Original-Vergrößerung x 400

3.2.5 Morphologie des RHVE nach primärer Infektion mit Laktobazillen und sekundärer Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314

Beimpft man das rekonstruierte humane Vaginalepithel bei einem Gesamtuntersuchungszeitraum von 12 Stunden zuerst für 6 Stunden mit Laktobazillen und gibt nach 6 Stunden *C. albicans* Wildtyp SC5314 hinzu, zeigt sich erneut zuerst ein leichtes ödematöses Anschwellen der Zellkerne und eine beginnende Vakuolenbildung. Pilzzellen lagern sich auf der Oberfläche an, ohne in das Epithel zu penetrieren (Abbildung 15). Im Vergleich zum gleichzeitigen Beimpfen des RHVE mit Laktobazillen und *C. albicans* Wildtyp SC5314 und Inkubation über denselben Untersuchungszeitraum fällt die Vakuolenbildung der Schleimhaut etwas geringer aus.

Beim Untersuchungszeitraum von 24 Stunden wurde ebenfalls zuerst mit Laktobazillen beimpft und erst nach 12 Stunden wurden Hefepilzzellen hinzu gegeben. Das Ergebnis fällt hier ebenfalls etwas besser aus, als wenn gleichzeitig mit Laktobazillen und *C. albicans* beimpft und für 24 Stunden inkubiert wird. Hefezellen dringen nicht in das Epithel ein, ein ödematöses Anschwellen der Zellen fällt im Vergleich geringer aus (Abbildung 16).

Am eindeutigsten zeigt sich ein protektiver Einfluss von Laktobazillen beim Untersuchungszeitraum von 36 Stunden. Wird die Haut für 18 Stunden zunächst nur mit Laktobazillen beimpft und werden nach 18 Stunden *C. albicans* Wildtyp SC5314 Hefepilz-Zellen hinzu gegeben, ist die Haut nach 36 Stunden noch immer intakt. Die Zellkerne sind zwar vereinzelt ebenfalls ödematös geschwollen (Abbildung 17). Vergleicht man das Ergebnis mit dem 36-Stunden-Ergebnis nach gleichzeitigem Beimpfen mit Laktobazillen und Pilzzellen, erscheint das RHVE insgesamt aber besser erhalten.

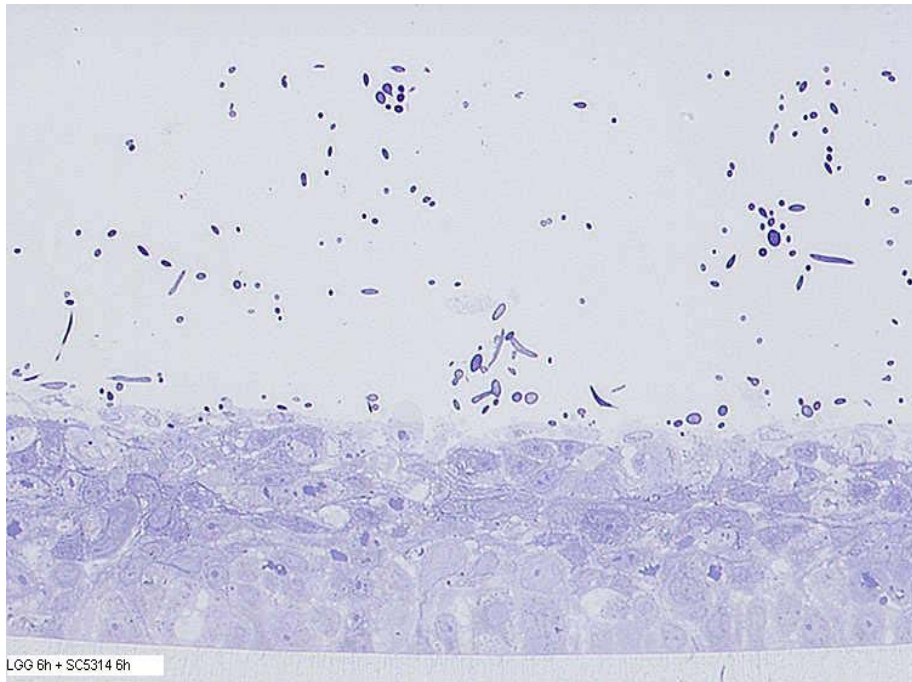


Abbildung 15: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, nach zeitversetzter Infektion mit *L. rhamnosus* GG für 6 Stunden und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Leichtes ödematöses Anschwellen der Zellen bzw. leichte Vakuolenbildung. Kein Durchdringen des RHVE durch Pilzzellen. Original-Vergrößerung x 400

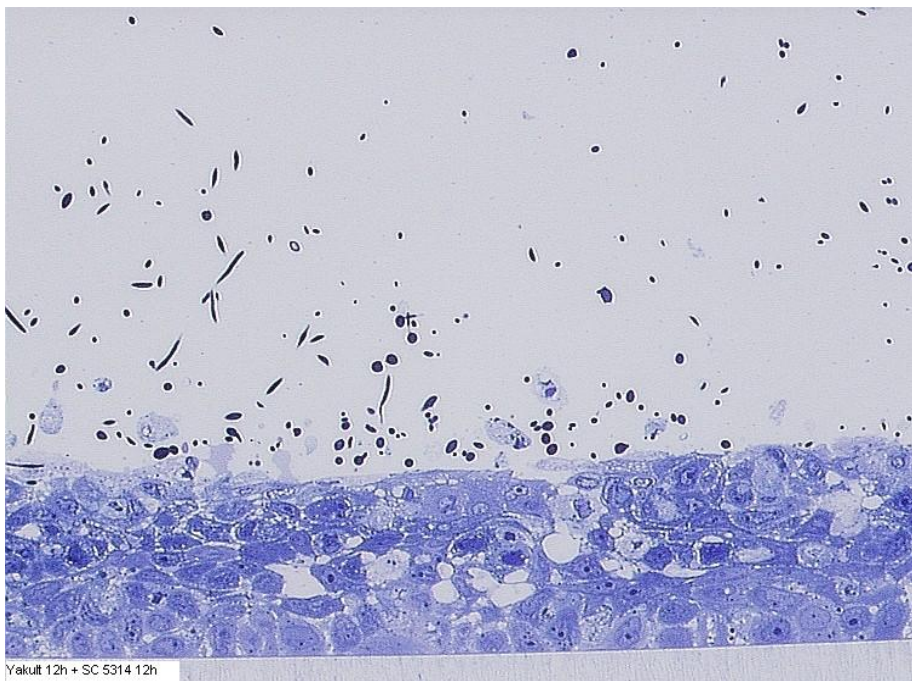


Abbildung 16: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, nach zeitversetzter Infektion mit *L. casei shirota* für 12 Stunden und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Leichte Zunahme der ödematösen Schwellung der Zellen, zunehmende Vakuolenbildung. Weiterhin kein Durchdringen des RHVE durch Pilzzellen. Original-Vergrößerung x 400

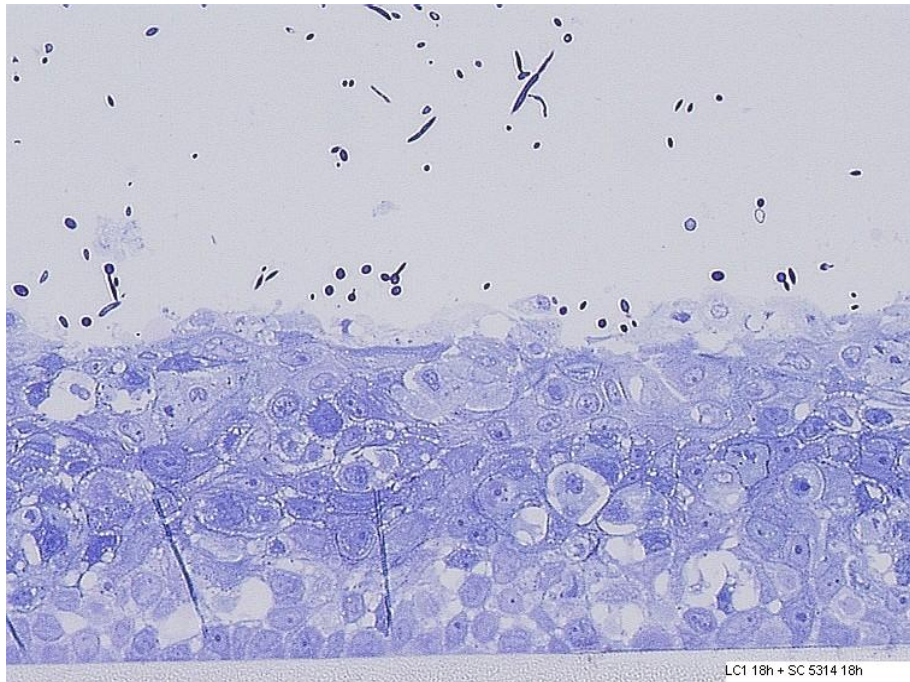


Abbildung 17: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, nach zeitversetzter Infektion mit *L. johnsonii* LA1 für 18 Stunden und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Trotz weiterer Zunahme der ödematösen Schwellung der Zellen und zunehmender Vakuolenbildung, im basalen Anteil des RHVE ist die Haut nach 36 Stunden intakt. Auch hier kein Durchdringen des RHVE durch Pilzzellen. Original-Vergrößerung x 400

3.2.6 Morphologie des RHVE nach primärer Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 und sekundärer Infektion mit Laktobazillen

Beimpft man das rekonstruierte humane Vaginalepithel initial mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 und gibt nach der Hälfte des jeweiligen Gesamtuntersuchungszeitraumes Laktobazillen hinzu, ist nach längerem Einwirken der Pilzzellen das Epithel so stark geschädigt, dass die zugegebenen Laktobazillen den Zellschaden nicht mehr revidieren können, eine protektive Wirkung ist nicht mehr zu erkennen.

Bereits nach 12 Stunden Gesamtinkubation mit einer Vorinkubationszeit von 6 Stunden kommt es zu einer Anlagerung von Hefepilzzellen an der Epitheloberfläche, vereinzelt dringen Hefen in das Epithel ein (Abbildung 18).

Nach 24 Stunden und somit einer Vorinkubationszeit von 12 Stunden lösen sich bereits Zellen aus den obersten Schichten des RHVE, es kommt zu einer Ödembildung bis in die tieferen Zellschichten (Abbildung 19).

Beimpft man zunächst 18 Stunden mit *C. albicans* Wildtyp SC 5314 und gibt erst dann Laktobazillen hinzu, zeigt sich zum Versuchsende nach 36 Stunden eine intensive Vakuolenbildung, Zellen aus den

basalen Zellschichten lösen sich aus dem RHVE. Die späte Gabe von Laktobazillen zeigt auch hier keine Wirkung, die Schleimhaut ist irreparabel geschädigt (Abbildung 20).

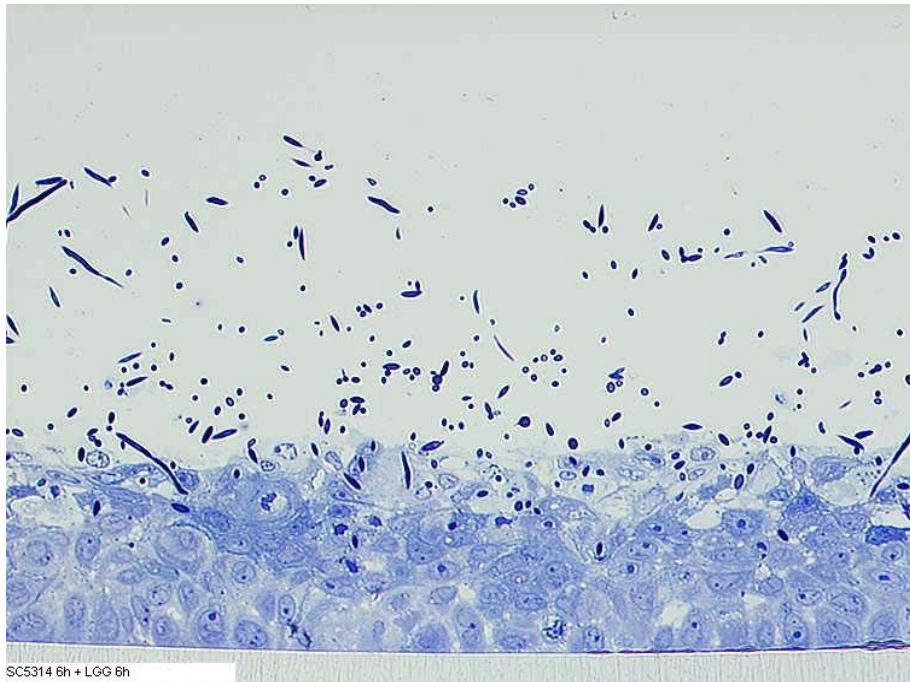


Abbildung 18: RHVE, nach zeitversetzter Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 für 6 Stunden und anschließender Infektion mit *L. rhamnosus* GG. Pilzzellen dringen bereits in das RHVE ein, beginnende Vakuolenbildung. Original-Vergrößerung x 400

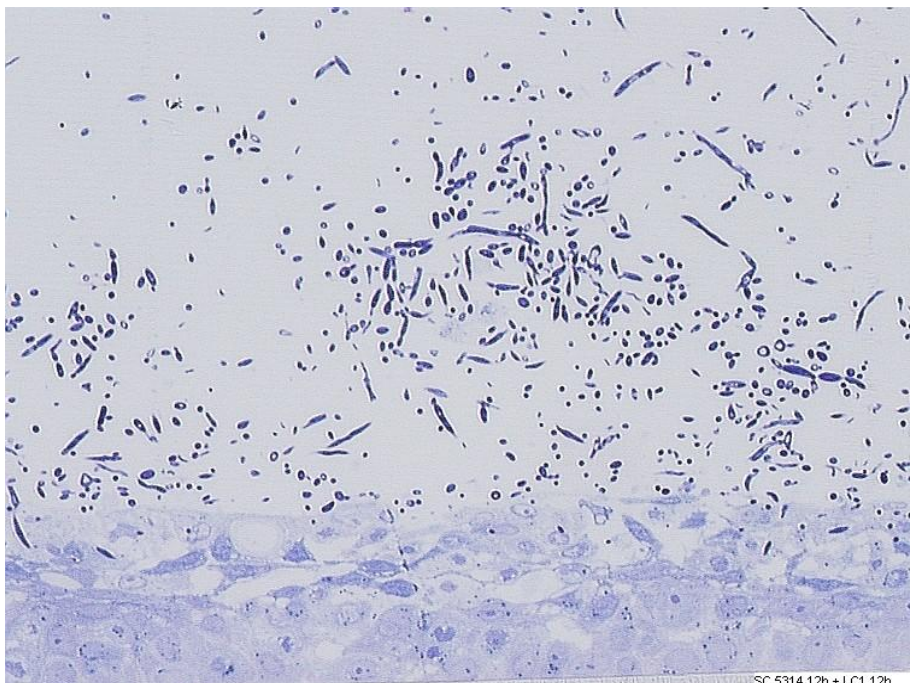


Abbildung 19: RHVE, nach zeitversetzter Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 für 12 Stunden und anschließender Infektion mit *L. johnsonii* LA1. Pilzzellen dringen weiter in das RHVE ein, Vakuolenbildung bis in tiefe Zellschichten, Zellen lösen sich aus der Schleimhaut. Die Schleimhaut erscheint bereits jetzt irreparabel geschädigt. Original-Vergrößerung x 400

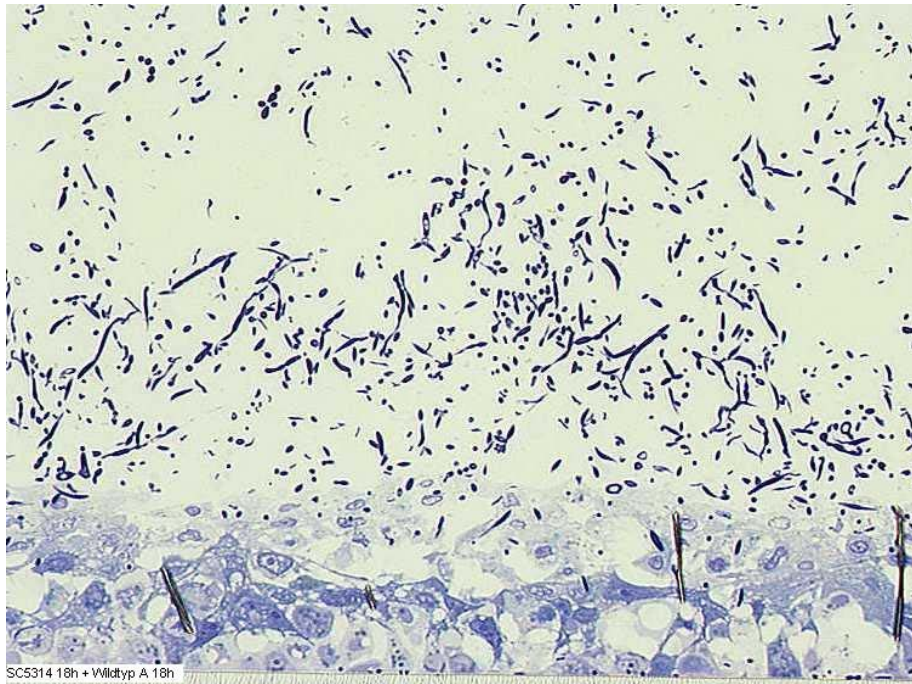


Abbildung 20: RHVE, nach zeitversetzter Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 für 18 Stunden und anschließender Infektion mit *L. acidophilus*. Pilzzellen sind bis in tiefe Schichten des RHVE eingedrungen, großlumige Vakuolen- bzw. Ödembildung bis zur Basalzellschicht. Irreparable Schädigung des Epithels ist anzunehmen. Original-Vergrößerung x 400

3.3 Quantitative RT-PCR Analyse

Alle in cDNA umgewandelten Proben wurden mittels quantitativer RT-PCR mit dem LightCycler auf eine Zytokinausschüttung hin untersucht. Die Untersuchung erfolgte auf eine Expression von Th1-assoziierten und proinflammatorisch wirkenden Zytokinen und Chemokinen, nämlich TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IFN- γ sowie dem Th2-assoziierten Zytokin IL-10. Als konstant exprimiertes Gen (Housekeeping-Gen) wurde GAPDH amplifiziert.

Insgesamt wurden 5 Laktobazillus-Arten (Actimel: *L. casei* *defensis*, LC1: *L. johnsonii* LAI, Yakult: *L. casei* *shirota*, LGG: *L. rhamnosus* GG, Wildtyp A: *L. acidophilus*) bzw. D-Laktat und hitzeinaktivierter LGG (LGG inaktiv: hitzeinaktiverter *L. rhamnosus* GG) untersucht. Von jeder untersuchten Art mussten pro Untersuchungszeitraum (12, 24 und 36 Stunden) jeweils 6 cDNA Proben im LightCycler auf eine Zytokin-Expression untersucht werden (PBS, SC5314, LAB, LAB + SC, LAB $\frac{1}{2}$ + SC $\frac{1}{2}$, SC $\frac{1}{2}$ + LAB $\frac{1}{2}$). Daraus ergab sich eine Gesamtmenge von 126 Proben.

Da nicht alle Versuche gleichzeitig durchgeführt werden konnten, kann ein Gesamtvergleich aller Proben nicht erfolgen. Bei den folgenden Ergebnissen handelt es sich immer um die relative Kopienanzahl für die jeweiligen Zytokine, bezogen auf die Leerwert-Kontrollen (PBS) der jeweiligen Untersuchungszeiträume, die in allen Versuchen gleich eins (PBS = 1) gesetzt wurden. Es wurde also ange-

nommen, dass in der Leerwert-Kontrolle keine Zytokine ausgeschüttet wurden und dass die Proben um die angegebenen Werte im Vergleich zu PBS hochreguliert wurden.

Prinzipiell ergab sich folgendes Muster bei der LightCycler-Analyse:

Vor allem bei den Untersuchungen der proinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 sowie der proinflammatorisch wirkenden Chemokine TNF- α und GM-CSF kam es zu einer Hochregulierung der Werte im Vergleich zur Leerwert-Kontrolle (PBS).

In der Regel ergab sich folgende Relation bei der Hochregulierung:

Die niedrigsten Quantitäten ergaben sich neben PBS bei den Proben, die nur Laktobazillen enthielten. Dies lässt eine protektive Wirkung vermuten.

Die höchsten Werte zeigten sich bei den Proben, die nur den *C. albicans* Wildtyp SC5314 enthielten, bzw. die zuerst mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und anschließend mit einem Laktobazillus-Stamm infiziert worden waren.

Im Vergleich dazu fiel die Hochregulation der oben genannten Zytokine bei den Proben, bei denen zeitgleich mit einem Laktobazillus-Stamm und dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 beimpft wurde oder bei Proben, bei denen zeitversetzt zuerst mit einem Laktobazillus-Stamm und danach mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 nachbeimpft wurde, vergleichsweise geringer aus, wenngleich die Werte immer noch höher sind als bei Proben, die nur Laktobazillen enthielten. Dennoch lässt sich auch hier ein protektiver Einfluss vermuten.

Dieses Phänomen zeigte sich im Grunde bei allen Laktobazillus-Arten, wenngleich die Relationen innerhalb eines Versuches teilweise nicht so ausgeprägt waren (z.B. TNF- α für *L. rhamnosus* GG 12 h) wie bei anderen Versuchen (z.B. GM-CSF für *L. casei* *defensis* 36 h).

Im typischen Fall nahmen die Werte bei längeren Untersuchungszeiträumen zu. Besonders eindrucksvoll zeigte sich dies beim 12-, 24- und 36 Stunden-Vergleich für GM-CSF, einem die Kolonienbildung von Granulozyten und Makrophagen stimulierenden Faktor.

Diese Verteilung der Zytokinausschüttung innerhalb der einzelnen Versuche zeigt sich auch beim Versuch mit D-Laktat, nicht aber bei den Versuchen mit hitzeinaktiviertem LGG. Hier ergaben sich die höchsten Quantifizierungen nicht wie erwartet für Proben mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314, sondern für die Proben, in denen nur hitzeinaktiverter LGG enthalten war. Teilweise erfolgte auch gar kein Nachweis in den Proben mit inaktivem LGG. Bei den Ergebnissen der Proben, in denen inaktivierter LGG und *C. albicans* Wildtyp SC5314 zusammen - sei es zeitgleich oder zeitversetzt - inkubiert wurden, lässt sich keine protektive Wirkung erkennen, da die Werte nicht deutlich unter denen für Proben liegen, in denen nur *C. albicans* Wildtyp SC5314 vorhanden ist.

Für die Zytokin-Untersuchungen von IL-10 und IFN- γ ergaben sich wenig erkennbare bzw. aussagekräftige Hochregulationen. Es kam nur vereinzelt zu (schwachen) Hochregulierungen der Zytokine, teilweise erfolgte gar kein Nachweis.

Die Berechnung der relativen Kopienanzahl soll nun anhand von einem Beispiel erläutert werden:

Aus der relativen Kopienanzahl bei Verwendung von Primern des Housekeeping-Gens GAPDH wird zunächst für die einzelnen Proben ein Abgleichfaktor errechnet, um Unterschiede in der Qualität und Quantität der cDNA berücksichtigen zu können (Tabelle 5).

Ausgehend vom Leerwert werden die ermittelten Zytokin-Kopienzahlen der einzelnen Probenwerte mit dem Abgleichfaktor aus Tabelle 1 multipliziert und dann in Relation zum Leerwert gesetzt (Tabellen 6-13).

GAPDH	Kopienzahl	Prozent der Kopienzahl	Faktor für Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-7	1,00E+01	-	-	25,53
PBS (Leerwert)	4,43E+02	100,00%	1,00	19,55
SC 5314	3,48E+02	78,59%	1,27	19,93
Actimel	2,21E+02	49,91%	2,00	20,65
Actimel + SC 5314	8,84E+02	199,59%	0,50	18,46
Actimel 6h + SC 5314 6h	1,22E+03	275,29%	0,36	17,95
SC 5314 6h + Actimel 6h	1,34E+03	303,52%	0,33	17,80
NTC	5,54E-04	0,00%	-	>41,00

Tabelle 6: Berechnung des Abgleichfaktors aus der unterschiedlichen Kopienanzahl für das Housekeeping-Gen GAPDH

TNF-alpha	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-6	1,00E+01	-	20,06
PBS (Leerwert)	1,50E-03	1,00	33,44
SC 5314	8,24E-03	6,97	30,85
Actimel	1,16E-03	1,54	33,84
Actimel + SC 5314	1,85E-03	0,62	33,13
Actimel 6h + SC 5314 6h	5,16E-03	1,25	31,57
SC 5314 6h + Actimel 6h	2,73E-02	5,98	29,04
NTC	2,67E-03	-	32,57

Tabelle 7: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für TNF- α nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

GM-CSF	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-6	1,00E+01	-	25,02
PBS (Leerwert)	1,08E-02	1,00	35,91
SC 5314	2,86E+00	335,59	27,02
Actimel	3,61E-03	0,67	37,66
Actimel + SC 5314	1,52E-01	7,04	31,69
Actimel 6h + SC 5314 6h	1,54E-01	5,14	31,68
SC 5314 6h + Actimel 6h	3,73E-01	11,34	30,26
NTC	3,35E-04	-	41,45

Tabelle 8: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für GM-CSF nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

IL-1 α	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-6	1,00E+01	-	20,44
PBS (Leerwert)	1,32E-01	1,00	27,45
SC 5314	1,75E+00	16,86	23,27
Actimel	3,22E-02	0,49	29,73
Actimel + SC 5314	6,73E-01	2,55	24,81
Actimel 6h + SC 5314 6h	1,32E+00	3,63	23,72
SC 5314 6h + Actimel 6h	1,39E+00	3,46	23,64
NTC	9,27E-04	-	35,48

Tabelle 9: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-1 α nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

IL-1 β	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-6	1,00E+01	-	20,00
PBS (Leerwert)	1,19E-01	1,00	26,81
SC 5314	6,72E-01	7,16	24,15
Actimel	3,12E-02	0,52	28,87
Actimel + SC 5314	3,64E-01	1,53	25,09
Actimel 6h + SC 5314 6h	6,50E-01	1,98	24,20
SC 5314 6h + Actimel 6h	4,00E-01	1,10	24,95
NTC	1,84E-03	-	33,22

Tabelle 10: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-1 β nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

IL-6	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-6	1,00E+03	-	19,68
PBS (Leerwert)	8,35E-02	1,00	34,54
SC 5314	2,28E+00	34,72	29,31
Actimel	5,46E-02	1,31	35,21
Actimel + SC 5314	5,14E-01	3,08	31,67
Actimel 6h + SC 5314 6h	8,98E-01	3,91	30,78
SC 5314 6h + Actimel 6h	1,47E+00	5,79	30,00
NTC	1,88E-01	-	33,26

Tabelle 11: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-6 nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

IL-8	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-6	1,00E+01	-	23,86
PBS (Leerwert)	1,40E+00	1,00	26,81
SC 5314	9,54E+00	8,65	23,93
Actimel	2,14E-01	0,31	29,64
Actimel + SC 5314	2,68E+00	0,96	25,84
Actimel 6h + SC 5314 6h	5,17E+00	1,34	24,85
SC 5314 6h + Actimel 6h	8,25E+00	1,94	24,15
NTC	2,67E-02	-	32,77

Tabelle 12: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-8 nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

IL-10	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-8	1,00E+03	-	23,62
PBS (Leerwert)	1,11E-02	1,00	>41,00
SC 5314	3,50E-01	40,19	35,74
Actimel	0,00E+00	0,00	0,00
Actimel + SC 5314	1,11E-02	0,50	>41,00
Actimel 6h + SC 5314 6h	1,11E-02	0,36	>41,00
SC 5314 6h + Actimel 6h	1,28E-01	3,80	37,27
NTC	1,36E-01	-	37,18

Tabelle 13: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-10 nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

IFN- γ	Kopienzahl	Nach Abgleich mit GAPDH	Crossing point
e-7	1,00E+02	-	25,71
PBS (Leerwert)	1,00E+00	1,00	>41,00
SC 5314	7,07E-03	0,01	>41,00
Actimel	7,02E-03	0,01	>41,00
Actimel + SC 5314	1,57E-01	0,08	36,04
Actimel 6h + SC 5314 6h	0,00E+00	0,00	0,00
SC 5314 6h + Actimel 6h	5,14E-01	0,17	34,14
NTC	7,07E-03	-	>41,00

Tabelle 14: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IFN- γ nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Die folgenden Abbildungen 21 bis 26 zeigen die grafische Darstellung der Ergebnisse der TNF- α - und GM-CSF-Expression in Gegenwart der getesteten Laktobazillus-Stämme bzw. von D-Laktat, in den verschiedenen untersuchten Zeiträumen. Die Abbildungen 27 bis 44 der Ergebnisse der weiteren untersuchten Zytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 sowie IFN- γ) sowie die zugehörigen Tabellen 1 bis 24 aller untersuchten Zytokine finden sich im Anhang:

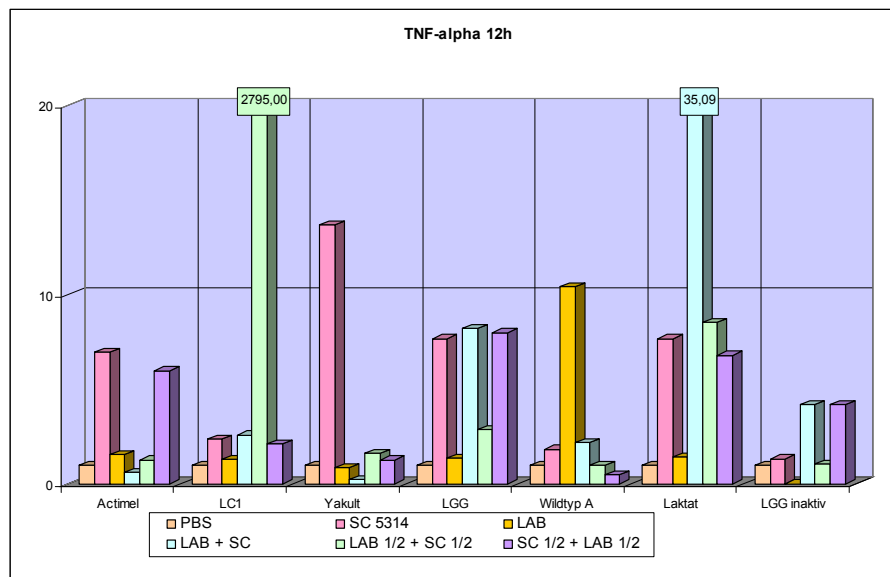


Abbildung 21: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

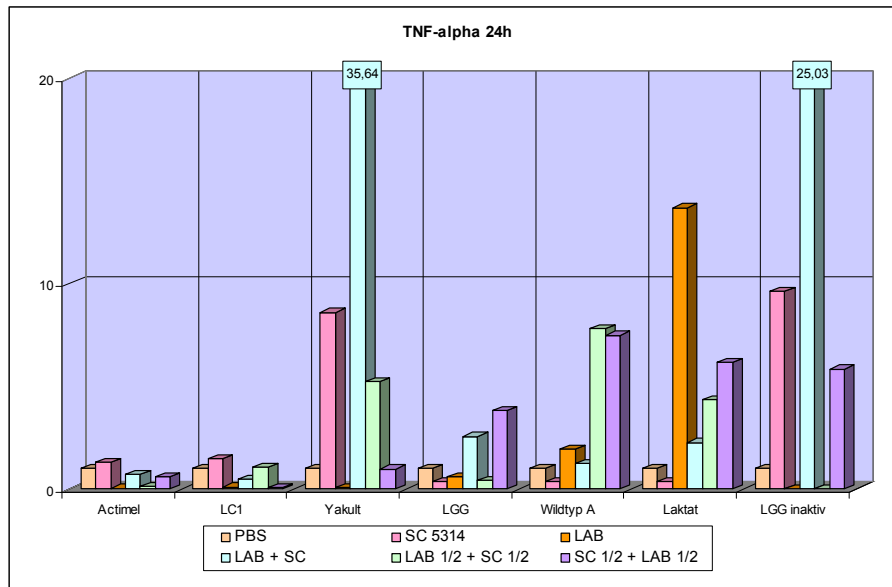


Abbildung 22: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

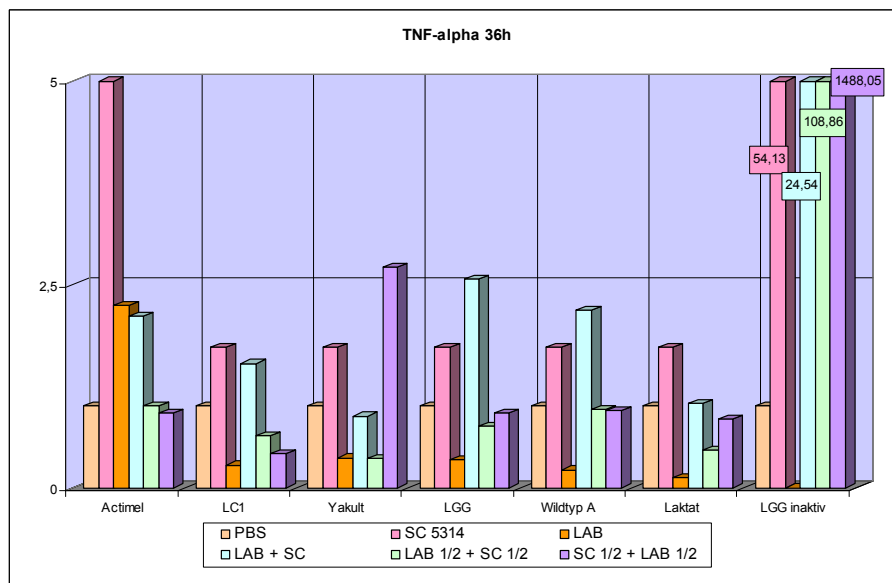


Abbildung 23: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

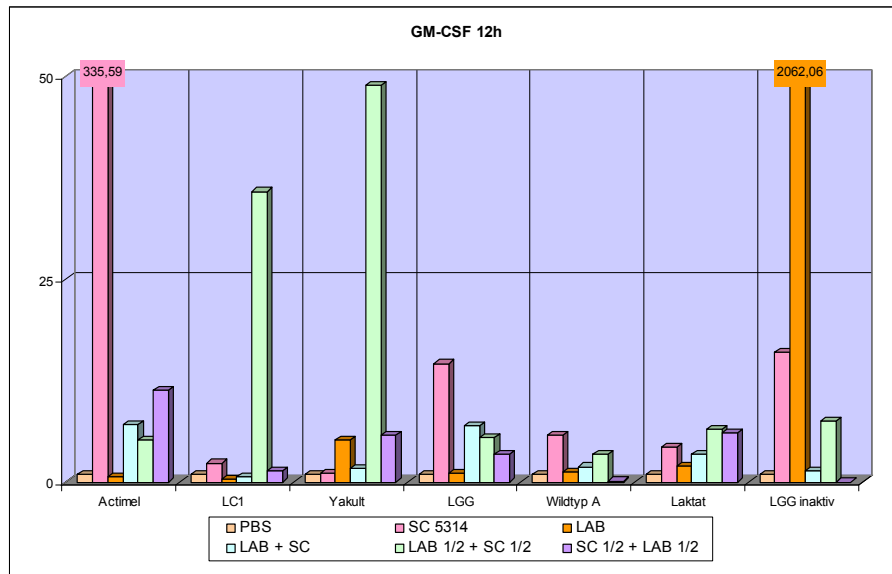


Abbildung 24: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

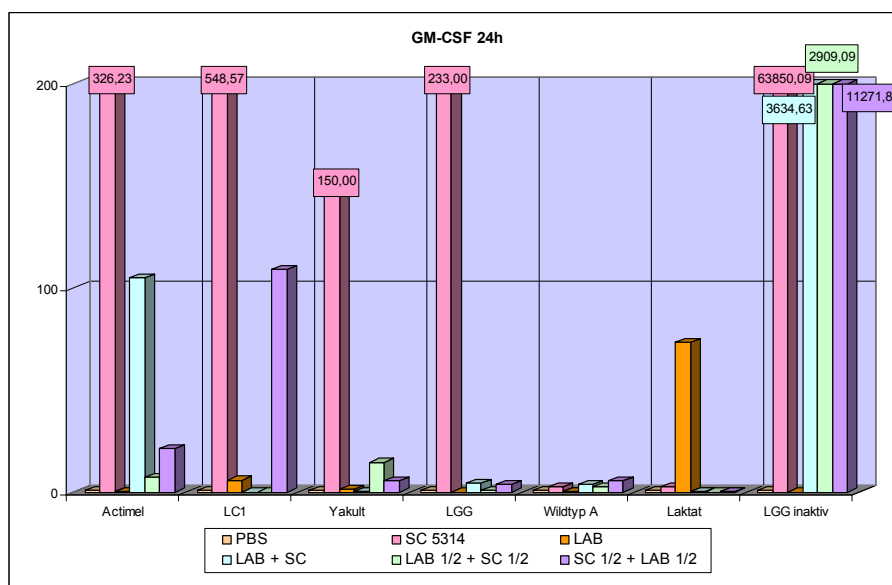


Abbildung 25: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

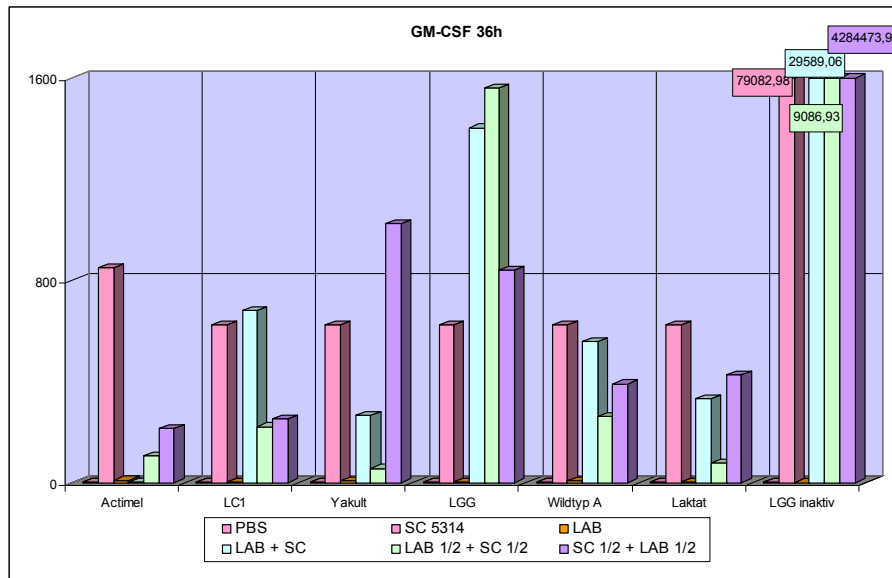


Abbildung 26: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

3.4 LDH-Bestimmung

Um das Ausmaß der Schädigung der Zellen in den verschiedenen RHVE besser vergleichen zu können, erfolgte neben der histologischen Auswertung zusätzlich die Messung der LDH-Konzentration in dem Nährmedium.

Die LDH-Konzentration der nicht infizierten Schleimhaut (Negativ-Kontrolle mit PBS), bei der die Schleimhaut voll intakt ist, zeigt über alle Untersuchungszeiträume die niedrigsten Werte.

Die Positiv-Kontrolle, also die mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infizierte Schleimhaut, zeigt im Zeitverlauf immer die höchsten LDH-Werte und steht somit im Zusammenhang mit dem bei der histologischen Auswertung beobachteten stärksten Epithel-Schädigung.

Die LDH-Konzentration der mit den verschiedenen Laktobazillen beimpften Schleimhaut zeigt bei allen Proben über alle Untersuchungszeiträume ähnlich niedrige Werte wie die Negativ-Kontrolle. Dies korreliert mit der ebenfalls intakten Schleimhaut bei der histologischen Auswertung.

Infiziert man das RHVE mit einem Laktobazillus-Stamm und *C. albicans* Wildtyp SC5314, steigt bei allen Ansätzen die LDH-Konzentration. Allerdings sieht man bei der zeitversetzten Gabe, bei der das RHVE zuerst mit Laktobazillen vorinkubiert und anschließend mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 infiziert wird, verhältnismäßig niedrigere Werte als bei der zeitversetzten Infektion des RHVE, bei der zuerst mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 und nach der Hälfte des Untersuchungszeitraumes mit einem Laktobazillus-Stamm infiziert wird.

Beimpft man das RHVE gleichzeitig mit Laktobazillen und dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 schwanken die LDH-Werte anfänglich zwischen den Werten der beiden zeitversetzten Ansätze, bei

den späteren Untersuchungspunkten tendieren sie eher in Richtung der Werte nach initialer Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 und anschließender Infektion mit Laktobazillen.

Die folgenden Abbildungen (Abbildungen 45 bis 51) zeigen die Ergebnisse der LDH-Messungen für die einzelnen Laktobazillen Stämme und Laktat. Die zugehörigen Tabellen finden sich im Anhang (Tabellen 39 bis 45).

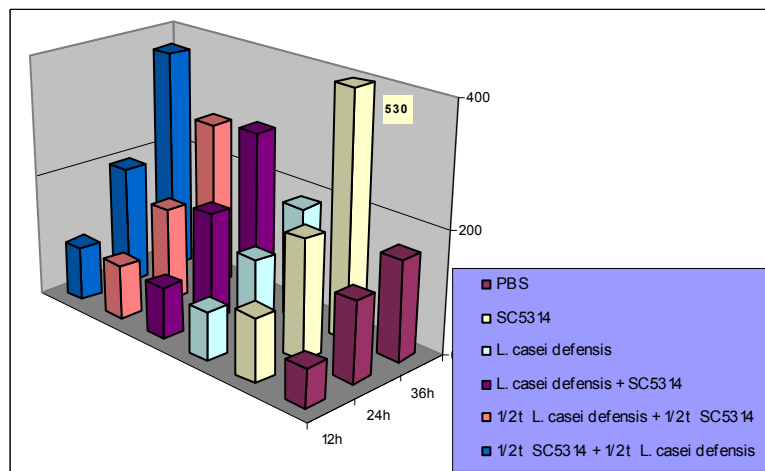


Abbildung 45: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. casei defensiv*

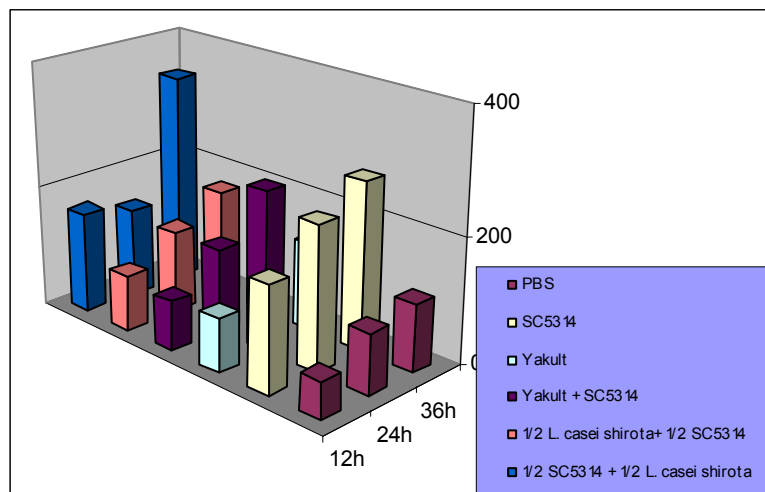


Abbildung 46: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. casei shirota*

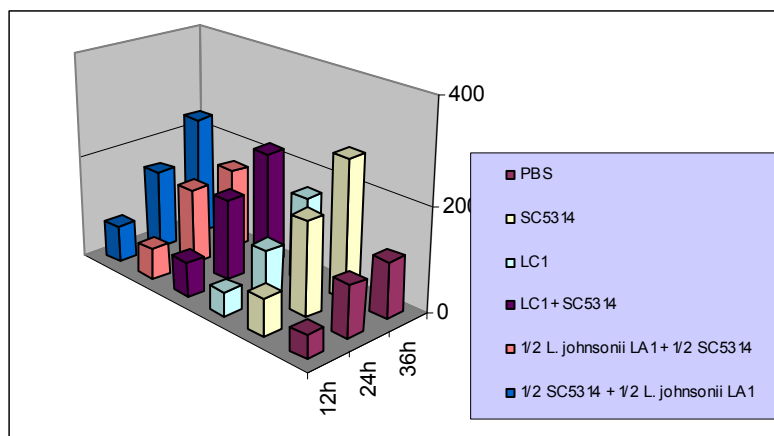


Abbildung 47: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. johnsonii* LA1

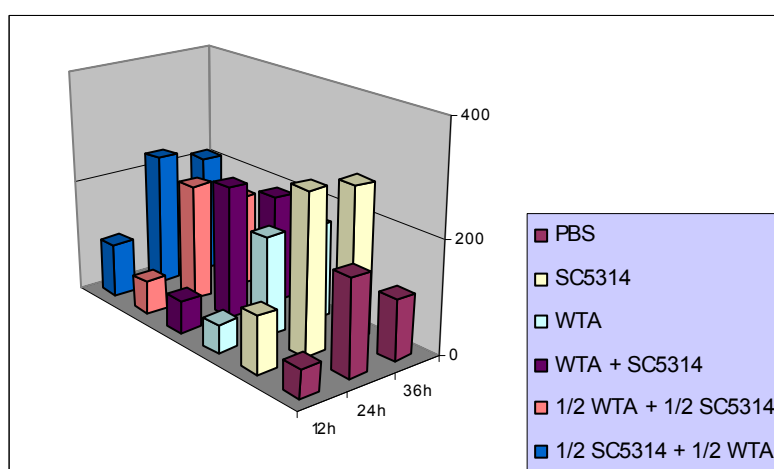


Abbildung 48: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. acidophilus*

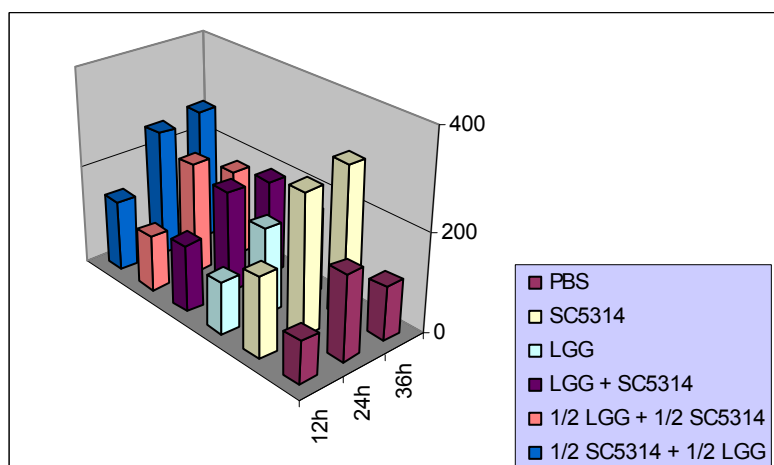


Abbildung 49: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. rhamnosus* GG

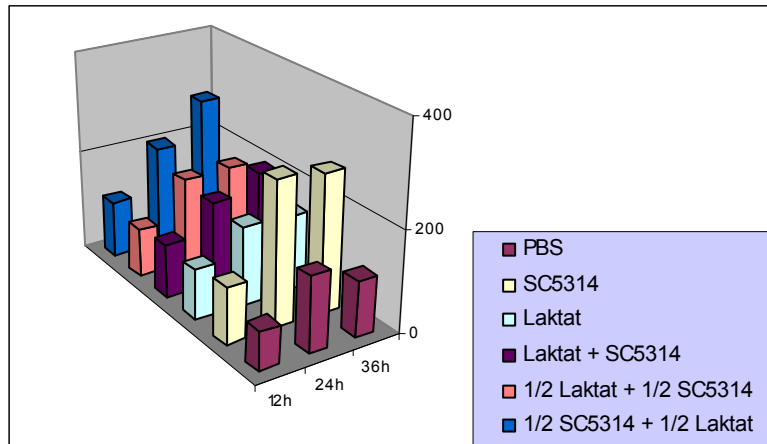


Abbildung 50: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für D-Laktat

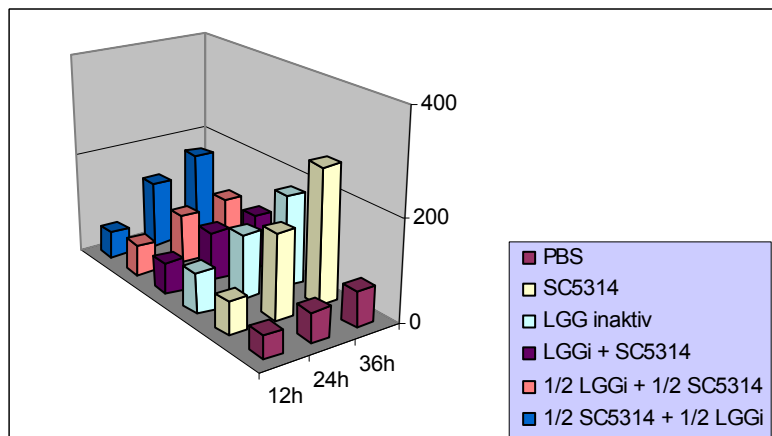


Abbildung 51: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für LGG inaktiv

Somit lässt sich zusammenfassend folgendes festhalten:

- Die LDH-Konzentrationen der Negativkontrollen zeigen immer die niedrigsten Werte.
- Die LDH-Konzentrationen der Positivkontrollen zeigen immer die höchsten Werte.
- Die LDH-Konzentrationen der alleine mit LAB infizierten RHVE zeigen ähnlich niedrige Werte wie die Negativkontrolle.
- Infiziert man das RHVE zuerst mit dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 und nach der Hälfte des Untersuchungszeitraumes mit Laktobazillen, sind die LDH-Konzentrationen deutlich höher als bei der initialen Beimpfung mit Laktobazillen und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314.
- Beimpft man das RHVE gleichzeitig mit Laktobazillen und dem *C. albicans* Wildtyp SC5314 bewegen sich die LDH-Werte anfänglich zwischen den Werten der zeitversetzten Infektion, nähern sich allerdings bei längeren Untersuchungszeiträumen den Werten der initial mit *C. albicans* Wildtyp S5314 infizierten RHVE an.

4 Diskussion

Probiotika sind dieser Tage in aller Munde. Die Werbung suggeriert die Einnahme „probiotisch-wirksamer“ Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmittel. Bei diesen Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmitteln und den pharmazeutischen Produkten, die probiotische Stämme enthalten, dominieren vor allem die Stämme der *Laktobazillus*-Spezies, darunter z.B. *L. casei* shirota, *L. rhamnosus* GG sowie einige Stämme der *L. acidophilus*-Spezies.

Diverse Forschungsgruppen haben die gesundheitsfördernde Wirkung der Stämme *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* und *L. johnsonii* in den letzten Jahren ausgiebig untersucht und dokumentiert. Besonders im Hinblick auf den gesundheitsfördernden Effekt bei urogenitalen Infektionen wurden zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Studien durchgeführt (35).

In dieser Arbeit wurde der Einfluß von fünf unterschiedlichen Laktobazillus-Stämmen auf die experimentelle Vaginalkandidose durch *C. albicans* untersucht. Basierend auf einem etablierten *ex vivo*-Modell der vaginalen Kandidose sollte der Einfluss der verschiedenen Stämme auf den Verlauf der vaginalen Infektion untersucht werden. Über den Untersuchungszeitraum von 12, 24 und 36 Stunden wurde der im Lichtmikroskop sichtbare bzw. biochemisch über die LDH-Freisetzung erfassbare Zellschaden beurteilt sowie die Wirtsantwort mittels Zytokin-Expression auf Gen-Ebene gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Das Modell des rekonstruierten humanen Vaginalepithels (RHVE), welches auf der Basis von *in vitro*-rekonstruiertem Epithel entwickelt wurde, ergibt mit *C. albicans* ein Krankheitsmodell der Vaginalkandidose. Es stellt ein hochdifferenziertes Abbild der menschlichen Vaginalschleimhaut dar und stimmt auch bezüglich der Morphologie, der Expression von Zytokinen sowie der biochemischen Charakterisierung gut mit der *in vivo*-Situation überein (57).

Histologisch konnte der protektive Einfluss von Laktobazillen im RHVE bestätigt werden. Bei Zugabe von Laktobazillus-Stämmen ist *C. albicans* nicht mehr in der Lage, sich an die Vaginalschleimhaut anzuheften, und einen Schaden an der Schleimhaut zu verursachen. Ein alleine mit *C. albicans* infiziertes RHVE zeigte, besonders im zeitlichen Verlauf, eine ausgeprägte Zellschädigung mit ödematöser Schwellung und Vakuolenbildung bis in tiefe Zellschichten. Dies stimmt mit der *in vivo*-Situation überein. Eine 36-stündige Inkubation mit *C. albicans* alleine führte zur weitgehenden Destruktion des RHVE, Pilzzellen drangen bis tief in die Basalzellschicht bzw. bis zur Polycarbonatträgerschicht durch. Die gleichzeitige Applikation oder Vorinkubation mit den einzelnen Laktobazillus-Stämmen führte zu einem deutlich geringeren Zellschaden am RHVE. Je länger die Laktobazillen alleine auf das RHVE einwirken können, desto geringer fällt der Zellschaden nach Zugabe von *C. albicans* aus. Dies bestätigt den von Reid et al. (46) gezeigten prophylaktischen Nutzen von Laktobazillen: nach täglicher Einnahme einer probiotischen Lösung konnten innerhalb von einer Woche die eingenommenen Keime in der Vagina nachgewiesen werden. Zusätzlich normalisierte sich die Scheidenflora bei 10 Frauen, die

an einer aktuell asymptomatischen rezidivierenden urogenitalen Infektion litten. Über den Untersuchungszeitraum von 16 Monaten traten keine weiteren Infektionen auf.

Bereits in einer *in vitro*-Studie konnte die Arbeitsgruppe um Reid zeigen, dass *L. acidophilus* und *L. rhamnosus* die Anheftung und das Wachstum von *C. albicans* hemmen kann (45). Sowohl *L. acidophilus* als auch *L. rhamnosus* GG sowie die in dieser Studie weiteren getesteten Stämme scheinen ebenfalls eine Anheftung an die Epitheloberfläche zu verhindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit denen der Gruppe um Reid überein.

Interessanterweise hatten alle getesteten Laktobazillus-Stämme einen protektiven Einfluss auf das RHVE. Kein Stamm erwies sich histologisch gesehen als besonders protektiv, in Umkehrung erwies sich kein Stamm als „nicht-protektiv“. Da man vermutet, dass verschiedene Mechanismen der Laktobazillen vor einer Infektion schützen, sei es das Anheften und somit Blockieren von spezifischen Rezeptoren an der Epitheloberfläche, sei es das Aufrechterhalten eines niedrigen pH in der Vagina, der das Wachstum von pathogenen Keimen verhindert, sei es die Produktion antimikrobieller Substanzen wie Milchsäure, Wasserstoffperoxid und Bakteriozinen oder die Produktion eines Biofilms, der die Adhäsion von pathogenen Keimen verhindert (46), da allerdings angenommen wird, dass nicht alle Laktobazillus-Stämme denselben Wirkmechanismus haben, stellt sich die Frage, welche entscheidende Eigenschaft von Laktobazillen vor einer Schädigung durch *C. albicans* bewahrt - wenn es denn eine solche gibt. Erkrankungen der Vagina gehen üblicherweise mit einer Abnahme der Laktobazillen-Anzahl einher. Hält man ein Laktobazillen-Level durch ständige Einnahme hoch – sei es durch lokale oder orale Zufuhr – könnte einer Erkrankung (z.B. einer Schädigung des Epithels durch *C. albicans*) vorgebeugt werden.

Zur alleinigen Therapie nach Schädigung des RHVE scheinen sich Laktobazillen nicht zu eignen. Histologisch zeigt sich nach vorheriger Inkubation mit *C. albicans* und anschließender Zugabe von Laktobazillus-Stämmen ein ähnlicher Epithel-Schaden wie bei alleiniger Infektion mit *C. albicans*. Ein geschädigtes Epithel kann also durch Laktobazillen nicht „repariert“ werden. Therapeutisch sollte hier zunächst eine lokale oder systemische medikamentöse Behandlung erfolgen. Zu einer Untersuchung dieser Hypothese eignet sich das RHVE allerdings womöglich nicht, da das Epithel nach 36-stündiger Inkubation mit *C. albicans* weitestgehend geschädigt ist.

Um den Zellschaden am RHVE nicht nur visuell darzustellen, sondern auch zu „messen“, bietet sich parallel zur Histologie die Beurteilung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentration im Nährmedium an. Diese korreliert in der vorliegenden Arbeit mit dem in der Histologie sichtbaren Zellschaden. So zeigen sich die höchsten LDH-Werte bei dem RHVE, welches alleine mit *C. albicans* infiziert wurde. Die niedrigsten Werte zeigen sich bei dem alleine mit PBS beimpften RHVE (Negativ-Kontrolle) bzw. bei der mit Laktobazillen beimpften Haut.

Je länger der Untersuchungszeitraum, desto höher sind ggf. die LDH-Werte. Auch bei den mit PBS oder mit Laktobazillen behandelten Schleimhautproben steigen über den gesamten Untersuchungszeitraum die LDH-Werte an. Dies ist in diesen Fällen auf die begrenzte Haltbarkeit des Epithels zurückzu-

führen. Auch wenn das Nährmedium alle 24 Stunden gewechselt werden muss, kann trotz sachgemäßer Behandlung des Epithels die Haltbarkeit nicht unbegrenzt ausgeweitet werden. Es tritt ein zunehmender Zellschaden ein, der mit dem Anstieg der LDH-Konzentration parallel verläuft.

Dennoch lässt sich bei Auswertung der LDH-Werte ebenfalls ein protektiver Einfluss von Laktobazillus-Stämmen zeigen. So sind die LDH-Werte der alleine mit Laktobazillen beimpften Haut ohnehin ähnlich niedrig wie die der PBS exponierten Haut, aber sowohl bei den Schleimhautproben, die gleichzeitig mit Laktobazillen und *C. albicans* beimpft wurden, als auch bei den Proben, bei denen mit Laktobazillen vorinkubiert wurde, bevor *C. albicans* zugegeben wurde, sind die LDH-Werte niedriger als bei den alleine mit *C. albicans* inkubierten Proben.

Somit kann auch über die Bestimmung der LDH-Werte ein protektiver Einfluss von Laktobazillen gezeigt werden. Besonders die frühzeitige Anwesenheit von Laktobazillen kann vor einem Hautschaden bewahren, wohingegen die nachträgliche Gabe nach bereits erfolgter Infektion mit *C. albicans* keine schützende Wirkung mehr zeigt.

Freilich lässt sich auch über die Beurteilung der LDH-Werte kein Laktobazillus-Stamm identifizieren, der besonders protektiv wirkt. Der direkte Vergleich der einzelnen Stämme auf Basis größenordnungsmäßig ähnlicher Werte verbietet sich, da die Messung der LDH-Werte eine Moment-Aufnahme darstellt und trotz genauestem Arbeiten über die gesamte Versuchsdauer mögliche Fehlerquellen wie z.B. Pipettierfehler oder Messungenauigkeiten nie ganz ausgeschlossen werden können.

Interessanterweise zeigte sich bei dem mit D-Laktat bzw. dem mit hitzeinaktiviertem *L. rhamnosus* behandelten RHVE ebenfalls ein protektiver Einfluss. Die eben beschriebenen Eigenschaften wie die unter PBS ähnlichen niedrigen LDH-Werte bei alleiniger Inkubation, die im Vergleich zu den anderen untersuchten Laktobazillen ähnlich niedrigen LDH-Werte speziell bei Vorinkubation mit D-Laktat bzw. hitzeinaktiviertem *L. rhamnosus* vor Zugabe von *C. albicans* lassen auf einen schützenden Effekt schließen. Welche Eigenschaft des D-Laktats letztlich für den protektiven Einfluss verantwortlich ist, sollte in weiteren Untersuchungen genau aufgeschlüsselt werden. Genauso interessant erscheint die Frage, welche Eigenschaft ein durch Hitze inaktivierter Laktobazillen-Stamm besitzt, der bewirkt, dass *C. albicans* keinen messbaren Zellschaden an der Haut bewirken kann. Bezüglich der Frage nach der Wirksamkeit von hitzeinaktivierten Laktobazillen konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass nach Fütterung von Mäusen mit Hitze-inaktivierten *L. casei*-Zubereitungen und anschließender Stimulation mit Allergenen (Ovalbumin) ein signifikant niedrigerer Wert von Ovalbumin-spezifischem IgE als bei nicht mit veränderten Probiotika gefütterten Mäusen vorhanden ist (33).

Speziell auf dem Gebiet der Immunantwort hat es bereits zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien gegeben, die gezeigt haben, dass Laktobazillen einen Einfluss auf die Regulation der Immunantwort besitzen. So stellt die Th1-assoziierte Immunantwort einen wichtigen Schritt in der Bekämpfung einer durch *C. albicans* bedingten Pilzinfektion dar (13). Grundsätzlich wird im Rahmen einer erfolgreichen Infektabwehr von einer Verschiebung der Immunantwort zugunsten einer Steigerung der Th1-

assoziierten bei Hemmung der Th2-assoziierten Immunantwort ausgegangen. Eine Verschiebung zugunsten einer Th1-assoziierten Immunantwort lässt sich durch Untersuchung der Zytokinausschüttung erfassen. So werden einige Zytokine dem Th1-Typ und somit den pro-inflammatorisch wirksamen Zytokinen zugerechnet. Diese dienen dann bei einer akuten Entzündung als Mediatoren zur Aktivierung, Chemotaxis und Adhäsion von Leukozyten. Von diesen Zytokinen ist bekannt, dass sie bei experimenteller Infektion von Epithelien mit *C. albicans* hochreguliert werden. So wurden die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF und TNF- α bei der Infektion mit *C. albicans* vermehrt ausgeschüttet gefunden. Weiterhin wurde geschlussfolgert, dass die Vaginalschleimhaut eine wichtige Quelle von pro-inflammatorisch wirksamen Zytokinen darstellt (58,66).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Applikation von Laktobazillen die Ausschüttung von pro-inflammatorisch wirksamen Zytokinen beeinflusst. Die pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine IL-1 α und β , IL-6, IL-8, TNF- α sowie besonders GM-CSF wurden bei der Infektion mit *C. albicans* hochreguliert. Das Th2-assoziierte IL-10 wurde, wie zu erwarten war, wenig reguliert. Das Th1-assoziierte IFN- γ wurde in dieser Versuchsreihe – anders als in anderen Arbeiten beschrieben – wenig bis gar nicht exprimiert. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Zytokin-Expression bei den Hautproben, bei denen nur mit *C. albicans* inkubiert wurde, deutlich ausgeprägter ist als bei Anwesenheit der einzelnen Laktobazillen-Stämme. Auch bei den Proben, bei denen die Schleimhaut sowohl mit *C. albicans* als auch mit Laktobazillen beimpft wurde, wurden die pro-inflammatorisch wirksamen Zytokine weniger stark exprimiert als bei den alleine mit *C. albicans* infizierten Schleimhautproben. Die Zytokinaktivierung kann bezüglich der Relationen mit dem Verhalten der LDH-Konzentrationen verglichen werden. Proben, die mit *C. albicans* alleine beimpft wurden, zeigen die höchste Zytokin-Expression. Proben, die alleine mit PBS bzw. mit den einzelnen Laktobazillen-Stämmen beimpft wurden, zeigen die niedrigsten Expressionsraten. Wurde mit Laktobazillen-Stämmen vorinkubiert, wurden die Zytokine deutlich weniger stark hochreguliert als bei alleiniger *C. albicans*-Infektion. Wurde die Schleimhaut zuerst mit *C. albicans* infiziert und erst anschließend mit Laktobazillen beimpft, zeigten sich die pro-inflammatorischen Zytokine deutlich hochreguliert. Das Th2-assoziierte IL-10 wurde – analog zur Infektion mit *C. albicans* alleine – auch bei den mit Laktobazillen behandelten Hautproben wenig bis gar nicht reguliert.

Auch bei der Behandlung des RHVE mit D-Laktat, einem von Laktobazillen gebildeten Stoffwechselprodukt, zeigten sich ähnliche Zytokinexpressionsraten wie bei den Laktobazillen-Stämmen. Vergleicht man die Werte der Zytokinausschüttung in Gegenwart des hitzeinaktivierten *L. rhamnosus* GG mit denen bei Anwesenheit des unveränderten *L. rhamnosus* GG oder mit denen unter den anderen Laktobazillen-Stämmen, so zeigt sich auch hier im Grundsatz eine ähnliche Verteilung der Zytokinausschüttung. Im Tiermodell konnte nach Fütterung von Mäusen mit einer Hitze-inaktivierten *L. casei*-Zubereitung eine höhere Th1-assoziierte sowie eine niedrigere Th2-assoziierte Zytokinproduktion demonstriert werden. Bei den Th1-assoziierten Zytokinen wurden IL-2 sowie IFN-gamma hochreguliert, die Th2-assoziierten Zytokine IL-4, IL-5 und IL-6 wurden wenig bis gar nicht hochreguliert.

gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von Laktobazillen bei den Mäusen eher eine Th1- als eine Th2-Antwort induziert wird (33). Dies stimmt mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen überein.

Somit lässt sich auch beim D-Laktat und beim hitzeinaktiviertem *L. rhamnosus* GG ein protektiver Einfluss vermuten. Welcher Wirkmechanismus einem protektiven Einfluss letztendlich zugrunde liegt, konnte in diesem Versuch nicht gezeigt werden. Die zielgerichtete Suche nach einem gemeinsamen Wirkmechanismus – sofern tatsächlich vorhanden-, z. B. durch Aufschlüsselung und Trennung der einzelnen Laktobazillen-Bestandteile auf Zellwand-Fraktionenebene, könnte hier weiteren Aufschluss geben und u.U. weitere therapeutische Ansätze ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz von Probiotika wird seit geraumer Zeit von der Werbung propagiert. Speziell Laktobazillen sind in vielen Nahrungs- und Nahrungsergänzungsmitteln, aber auch bei pharmazeutischen Produkten als probiotisch wirksame Stämme enthalten. Die gesundheitsfördernde Wirkung von Grampositiven Laktobazillen, die im menschlichen Körper einen normalen Teil der oralen, intestinalen und urogenitalen Mikroflora darstellen, aber auch tierischen oder pflanzlichen Ursprungs sein können, wird seit gut 100 Jahren beschrieben und von diversen Forschungsgruppen untersucht.

Typische Anwendungsgebiete von Laktobazillen sind die Therapie und Prävention von Durchfallerkrankungen, speziell bei Laktoseintoleranz und durch Rotaviren ausgelösten Diarrhöen bei Kindern, sowie die Therapie und Prävention von atopischen Erkrankungen und im Besonderen des atopischen Ekzems.

Hauptaugenmerk dieser Arbeit stellt die protektive und therapeutische Wirkung von Laktobazillen bei urogenitalen Infektionen, speziell bei der Vaginalkandidose, dar. Diese vor allem durch den Hefepilz *C. albicans* ausgelöste und nicht selten zu Rezidiven neigende Erkrankung zählt neben der bakteriellen Vaginose und der Harnwegsinfektion mit mehr als 300 Millionen Fällen pro Jahr zu den drei weltweit am häufigsten auftretenden urogenitalen Erkrankungen beim weiblichen Geschlecht.

Die hier vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, den Einfluss unterschiedlicher Laktobazillus-Arten auf die experimentelle Vaginalkandidose durch *C. albicans* zu untersuchen. Basierend auf einem etablierten Schleimhautmodell eines rekonstruierten humanen Vaginalepithels (RHVE), welches in seiner Morphologie, der Zytokin-Expression sowie seiner biochemischen Charakterisierung gut mit der *in vivo*-Situation übereinstimmt, wurde der Einfluss unterschiedlicher Laktobazillus-Arten bzw. Varietäten auf den Verlauf einer vaginalen Infektion mit *C. albicans* untersucht.

Insgesamt wurden fünf Laktobazillen-Stämme verwendet: Vier Stämme stammen aus Nahrungsmitteln bzw. Nahrungsergänzungsmitteln (*L. johnsonii* LA1, *L. casei* *defensis*, *L. casei* *shirota*, *L. rhamnosus* GG). Ein Stamm entstammt einem Vaginalabstrich einer Patientin, die sich in der Poliklinik der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der LMU München vorstellte (*L. acidophilus*). Nach der Anzucht wurden die Stämme zur weiteren Verwendung isoliert und klassifiziert. Neben den fünf Laktobazillen-Stämmen wurde der protektive Einfluss von D-Laktat, welches von Laktobazillen als Stoffwechselprodukt gebildet wird, sowie von dem durch Hitze inaktivierten Stamm *L. rhamnosus* GG untersucht.

Die Hautproben des RHVE wurden alleine mit Laktobazillen bzw. D-Laktat, alleine mit *C. albicans*, gleichzeitig mit Laktobazillen bzw. D-Laktat und *C. albicans* oder zunächst mit Laktobazillen bzw. D-Laktat und nach Ablauf der Hälfte des Untersuchungszeitraumes mit *C. albicans* oder umgekehrt zunächst mit *C. albicans* und nach Ablauf der Hälfte des Untersuchungszeitraumes mit Laktobazillen oder D-Laktat beimpft.

Nach einem Untersuchungszeitraum von 12, 24 und 36 Stunden erfolgten eine Beurteilung des histologisch sichtbaren Zellschadens im Lichtmikroskop sowie eine Messung der LDH-Konzentration im Nährmedium, welche bei Zellschädigung steigt und somit den Vergleich des Ausmaßes einer Schädigung ermöglicht. Weiterhin erfolgte die Messung der Zytokin-Expression der Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , GM-CSF sowie IFN- γ mittels RT-PCR. Letztlich wurde versucht, die Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Laktobazillen-Arten untereinander zu vergleichen.

Histologisch konnte ein protektiver Einfluss der untersuchten Laktobazillus-Stämme sowie von D-Laktat und hitzeinaktiviertem *L. rhamnosus* GG gezeigt werden. Zeigte sich bei alleiniger Infektion des RHVE mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 nach spätestens 36 stündiger Inkubation eine weitgehende Destruktion der Schleimhautproben, war die Schleimhaut nach Beimpfen mit den untersuchten Laktobazillus-Stämmen intakt. Die gleichzeitige Applikation und besonders die Vorinkubation mit Laktobazillus-Stämmen führte zu einem deutlich geringeren Zellschaden als bei alleiniger Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Histologisch erwiesen sich alle getesteten Stämme als protektiv, ohne dass sich ein einzelner Stamm als besonders protektiv hervorhob.

Zur Therapie nach einer Schädigung mit *C. albicans* scheinen sich Laktobazillen nicht zu eignen.

Histologisch zeigte sich nach Vorinfektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 und anschließender Zugabe von Laktobazillus-Stämmen ein ähnlich ausgeprägter Schaden am RHVE wie bei alleiniger Infektion mit *C. albicans*.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentration im Nährmedium korrelierten mit dem histologisch sichtbaren Zellschaden. Die niedrigsten Werte ergaben sich bei der Negativ-Kontrolle sowie bei der mit Laktobazillen bzw. D-Laktat beimpften Schleimhaut. Je länger der Untersuchungszeitraum war, umso höher waren die gemessenen LDH-Konzentrationen. Bei gleichzeitiger Inkubation oder Vorinkubation mit den getesteten Stämmen ergaben sich niedrigere LDH-Werte als bei Nachinkubation oder gar alleiniger Infektion durch *C. albicans*. Somit konnte auch durch Messung der LDH-Konzentration ein protektiver Einfluss von Laktobazillen gezeigt werden.

Auf Genebene konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass die Applikation von Laktobazillen bzw. D-Laktat die Ausschüttung der pro-inflammatorisch wirksamen Zytokine IL-1 α und β , IL-6, IL-8, TNF- α sowie besonders GM-CSF beeinflusst. Diese wurden bei der alleinigen Infektion mit *C. albicans* deutlich hochreguliert. Wurde alleine mit den Laktobazillen-Stämmen inkubiert, kam es zu deutlich geringeren Hochregulierungen der Zytokine. Ähnlich niedrige Expressionsmuster ergaben sich bei Vorinkubation bzw. gleichzeitiger Inkubation mit Laktobazillen, während eine Nachinkubation nach Infektion mit *C. albicans* ähnlich hohe Werte wie bei alleiniger *C. albicans* Infektion ergab.

Die Ergebnisse lassen insgesamt einen protektiven Einfluss der getesteten Laktobazillen sowie des D-Laktat vermuten und geben Anlass, im Rahmen weiterer Studien nach einem genauen Wirkmechanismus für diesen protektiven Einfluss zu suchen.

6 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus (48)

Abbildung 2: schematische Darstellung des LightCycler-Messinstruments (49)

Abbildung 3: 12 Stunden altes, nicht infiziertes rekonstruiertes humanes Vaginalepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 4: 24 Stunden altes, nicht infiziertes rekonstruiertes humanes Vaginalepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 5: 36 Stunden altes, nicht infiziertes rekonstruiertes humanes Vaginalepithel bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 6: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 12h nach Infektion mit LC1 (*L. johnsonii* LA1), bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 7: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 24h nach Infektion mit *L. casei shirota*, bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 8: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 36 nach Infektion mit *L. casei shirota*, bestehend aus 6-8 Zellschichten und einer Polykarbonatträgerschicht; Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 9: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 12 h nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Sichtbare Bildung von inter- und intrazellulären Ödemen in den oberen Zellschichten, beginnende Adhäsion von Hefezellen an der Schleimhautoberfläche. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 10: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 24 h nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Herauslösen von Zellen aus den oberen Zellschichten des Epithels, ödematöse Schwellung bis in tiefe Zellschichten mit deutlicher Adhäsion von Hefezellen an der Schleimhautoberfläche. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 11: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 36h nach Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Zerfall des Epithels, Pilzzellen sind bis zur Basalzellschicht durchgedrungen. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 12: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 12 h nach Infektion mit *L. rhamnosus* GG und *C. albicans* Wildtyp SC5314. Beginnende Vakuolen- bzw. Ödembildung im Epithel mit oberflächlicher Anlagerung von Hefezellen ohne Eindringen in das Epithel. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 13: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 24 h nach Infektion mit *L. acidophilus* und *C. albicans* Wildtyp SC5314. Deutlich verstärkte Vakuolenbildung, auch der basal gelegenen Zellen, vermehrte oberflächliche Anlagerung von Hefezellen, weiterhin ohne Eindringen in das Epithel. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 14: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, 36 h nach Infektion mit *L. casei shirota* und *C. albicans* Wildtyp SC5314. Großvolumige Vakuolenbildung bei erhaltenem Zellverbund. Eine Besiedelung des RHVE durch Pilzzellen hat weiterhin nicht stattgefunden. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 15: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, nach zeitversetzter Infektion mit *L. rhamnosus* GG für 6 Stunden und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Leichtes ödematöses Anschwellen der Zellen bzw. leichte Vakuolenbildung. Kein Durchdringen des RHVE durch Pilzzellen. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 16: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, nach zeitversetzter Infektion mit *L. casei shirota* für 12 Stunden und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Leichte Zunahme der ödematösen Schwellung der Zellen, zunehmende Vakuolenbildung. Weiterhin kein Durchdringen des RHVE durch Pilzzellen. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 17: rekonstruiertes humanes Vaginalepithel, nach zeitversetzter Infektion mit *L. johnsonii* LA1 für 18 Stunden und anschließender Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314. Trotz weiterer Zunahme der ödematösen Schwellung der Zellen und zunehmender Vakuolenbildung, im basalen Anteil des RHVE ist die Haut nach 36 Stunden intakt. Auch hier kein Durchdringen des RHVE durch Pilzzellen. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 18: RHVE, nach zeitversetzter Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 für 6 Stunden und anschließender Infektion mit *L. rhamnosus* GG. Pilzzellen dringen bereits in das RHVE ein, beginnende Vakuolenbildung. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 19: RHVE, nach zeitversetzter Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 für 12 Stunden und anschließender Infektion mit *L. johnsonii* LA1. Pilzzellen dringen weiter in das RHVE ein, Vakuolenbildung bis in tiefe Zellschichten, Zellen lösen sich aus der Schleimhaut. Die Schleimhaut erscheint bereits jetzt irreparabel geschädigt. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 20: RHVE, nach zeitversetzter Infektion mit *C. albicans* Wildtyp SC5314 für 18 Stunden und anschließender Infektion mit *L. acidophilus*. Pilzzellen sind bis in tiefe Schichten des RHVE eingedrungen, großlumige Vakuolen- bzw. Ödembildung bis zur Basalzellschicht. Irreparable Schädigung des Epithels ist anzunehmen. Original-Vergrößerung x 400

Abbildung 21: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF-alpha nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

Abbildung 22: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF-alpha nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

Abbildung 23: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF-alpha nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

Abbildung 24: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

Abbildung 25: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

Abbildung 26: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

Abbildung 27: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Abbildung 28: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Abbildung 29: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Abbildung 30: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Abbildung 31: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Abbildung 32: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Abbildung 33: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Abbildung 34: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Abbildung 35: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Abbildung 36: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Abbildung 37: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Abbildung 38: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Abbildung 39: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Abbildung 40: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Abbildung 41: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Abbildung 42: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Abbildung 43: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Abbildung 44: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Abbildung 45: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. casei defensis*

Abbildung 46: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. casei shirota*

Abbildung 47: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. johnsonii LA1*

Abbildung 48: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. acidophilus*

Abbildung 49: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für *L. rhamnosus GG*

Abbildung 50: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für D-Laktat

Abbildung 51: Verteilung und zeitlicher Verlauf der LDH-Werte für LGG inaktiv

7 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die zu den Probiotika zählenden Mikroorganismen (24)

Tabelle 2: Übersicht über die Anzahl an Laktobazillen beim gesunden Menschen (3)

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Laktobazillus-Stämme

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer

Tabelle 5: Ergebnis der Laktobazillen-Identifizierung durch das API 50 CH System

Tabelle 6: Berechnung des Abgleichfaktors aus der unterschiedlichen Kopienanzahl für das Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 7: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für TNF- α nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 8: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für GM-CSF nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 9: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-1 α nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 10: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-1 β nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 11: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-6 nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 12: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-8 nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 13: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IL-10 nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 14: Berechnung der relativen Kopienanzahl der Proben für IFN- γ nach Abgleich mit dem Housekeeping-Gen GAPDH

Tabelle 15: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 16: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 17: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 18: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 19: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 20: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 21: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 22: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 23: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 24: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 25: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 26: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 27: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 28: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 29: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 30: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 31: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 32: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 33: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 34: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 35: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 36: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden (Anhang)

Tabelle 37: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden (Anhang)

Tabelle 38: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden (Anhang)

Tabelle 39: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. casei defensis* (12, 24 und 36h) (Anhang)

Tabelle 40: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. casei shirota* (12, 24 und 36h) (Anhang)

Tabelle 41: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. johnsonii* LA1 (12, 24 und 36h) (Anhang)

Tabelle 42: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. acidophilus* (12, 24 und 36h) (Anhang)

Tabelle 43: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. rhamnosus* GG (12, 24 und 36h) (Anhang)

Tabelle 44: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für D-Laktat (12, 24 und 36h) (Anhang)

Tabelle 45: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für LGG inaktiv (12, 24 und 36h) (Anhang)

8 Anhang

8.1 Tabellen

	<i>L. casei</i> <i>defensis</i> (Actimel)	<i>L. johnso-</i> <i>nii</i> LA1 (LC1)	<i>L. casei</i> <i>shirota</i> (Yakult)	<i>L. rhamno-</i> <i>sus</i> GG (LGG)	<i>L. acido-</i> <i>philus</i> (Wildtyp A)	D-Laktat (Laktat)	<i>L. rhamnosus</i> GG inaktiv (LGG inaktiv)
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	6,97	2,35	13,69	7,66	1,82	7,66	1,31
Laktobazillus-Stamm (LAB)	1,54	1,28	0,86	1,37	10,41	1,40	0,00
LAB + SC 5314 (SC)	0,62	2,58	0,23	8,23	2,15	35,09	4,20
LAB ½ t + SC ½ t	1,25	2795,00	1,59	2,85	0,96	8,51	1,01
SC ½ t + LAB ½ t	5,98	2,13	1,26	7,99	0,47	6,79	4,17

Tabelle 15: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	1,29	1,48	8,59	0,36	0,36	0,36	9,61
LAB	0,03	0,08	0,04	0,59	1,94	13,70	0,00
LAB + SC	0,70	0,47	35,64	2,55	1,22	2,25	25,03
LAB ½ t + SC ½ t	0,12	1,06	5,21	0,42	7,80	4,33	0,00
SC ½ t + LAB ½ t	0,57	0,04	0,97	3,79	7,48	6,18	5,83

Tabelle 16: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	5,15	1,73	1,73	1,73	1,73	1,73	54,13
LAB	2,24	0,28	0,37	0,35	0,22	0,13	0,00
LAB + SC	2,11	1,53	0,88	2,56	2,18	1,04	24,54
LAB ½ t + SC ½ t	1,01	0,64	0,36	0,76	0,96	0,46	108,86
SC ½ t + LAB ½ t	0,92	0,42	2,71	0,92	0,95	0,84	1488,05

Tabelle 17: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für TNF- α nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	335,59	2,32	1,14	14,59	5,70	4,28	16,00
LAB	0,67	0,33	5,10	1,10	1,23	1,99	2062,06
LAB + SC	7,04	0,67	1,66	6,93	1,92	3,39	1,41
LAB ½ t + SC ½ t	5,14	35,80	48,88	5,47	3,39	6,47	7,49
SC ½ t + LAB ½ t	11,34	1,36	5,71	3,48	0,14	6,02	0,00

Tabelle 18: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	326,23	548,57	150,00	233,00	2,33	2,33	63850,09
LAB	0,25	5,88	1,37	0,04	0,13	73,40	0,00
LAB + SC	105,00	0,00	0,10	4,37	3,94	0,18	3634,63
LAB ½ t + SC ½ t	7,27	0,00	14,61	0,77	2,71	0,05	2909,09
SC ½ t + LAB ½ t	21,29	109,00	5,47	3,99	5,55	0,41	11271,88

Tabelle 19: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	849,50	622,77	622,77	622,77	622,77	622,77	79082,98
LAB	8,93	3,27	8,10	1,51	7,46	3,90	0,00
LAB + SC	3,32	677,98	264,62	1403,19	557,62	331,74	29589,06
LAB ½ t + SC ½ t	106,31	220,42	56,76	1560,24	258,99	78,81	9086,93
SC ½ t + LAB ½ t	214,45	253,08	1021,30	839,57	390,87	423,33	4284473,94

Tabelle 20: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für GM-CSF nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	16,86	5,14	22,00	3,48	3,40	3,48	1,33
LAB	0,49	1,70	0,49	0,81	1,57	1,41	758,00
LAB + SC	2,55	3,39	1,81	2,86	4,49	6,15	1,13
LAB ½ t + SC ½ t	3,63	6,79	4,35	4,78	3,77	11,03	2,96
SC ½ t + LAB ½ t	3,46	5,01	3,61	1,89	10,09	8,16	1,87

Tabelle 21: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	11,72	8,85	18,57	6,32	6,32	6,32	2,20
LAB	0,65	0,07	4,11	0,59	1,15	1,32	86,57
LAB + SC	3,90	0,97	1,13	4,77	8,20	6,23	0,35
LAB ½ t + SC ½ t	2,70	4,13	5,91	7,43	6,17	4,25	0,08
SC ½ t + LAB ½ t	4,22	4,40	5,92	3,36	0,03	3,61	1,75

Tabelle 22: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	13,23	38,46	38,46	18,90	38,46	38,46	2,77
LAB	0,45	8,82	4,50	1,94	19,70	2,38	0,00
LAB + SC	3,08	53,63	11,51	14,53	65,78	60,41	0,83
LAB ½ t + SC ½ t	4,16	64,33	28,48	48,77	27,61	20,33	25,32
SC ½ t + LAB ½ t	2,16	47,21	38,52	20,27	23,77	23,77	30,65

Tabelle 23: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	7,16	1,78	12,94	3,45	1,60	3,45	1,29
LAB	0,52	1,78	1,32	1,31	0,22	1,72	18,22
LAB + SC	1,53	1,59	2,08	2,72	0,60	2,81	0,84
LAB ½ t + SC ½ t	1,98	203,40	0,73	3,10	0,60	6,14	1,18
SC ½ t + LAB ½ t	1,10	1,47	2,21	2,47	1,53	4,25	0,40

Tabelle 24: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	8,38	34,13	13,32	4,52	4,52	4,52	9,86
LAB	1,04	11,82	3,52	0,70	1,92	2,86	7,06
LAB + SC	2,92	5,64	1,74	5,06	8,47	12,01	0,22
LAB ½ t + SC ½ t	0,75	0,77	2,17	1,82	4,21	2,65	0,62
SC ½ t + LAB ½ t	2,27	3,32	4,69	6,47	7,75	8,40	1,62

Tabelle 25: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	18,70	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	44,35
LAB	1,26	0,83	1,70	1,20	2,81	1,15	0,84
LAB + SC	3,63	10,78	2,97	6,37	8,74	7,70	11,45
LAB ½ t + SC ½ t	1,65	3,61	2,08	9,60	2,40	2,58	2,99
SC ½ t + LAB ½ t	3,03	7,13	5,69	14,47	4,24	5,48	335,57

Tabelle 26: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	34,72	0,12	15,00	7,42	0,93	7,42	0,29
LAB	1,31	5,00	3,70	1,40	3,66	1,04	49,83
LAB + SC	3,08	0,02	2,27	2,97	5,44	2,37	0,00
LAB ½ t + SC ½ t	3,91	11353,00	0,67	18,86	2,03	5,21	0,05
SC ½ t + LAB ½ t	5,79	0,02	0,73	2,29	205,99	2,35	23,05

Tabelle 27: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	0,10	5,31	5,31	44,80	36,33	36,33	2,70
LAB	0,04	33,69	0,59	4,00	10,36	261,15	294,25
LAB + SC	3,08	25,46	5,38	100,25	16,32	14,42	0,97
LAB ½ t + SC ½ t	3,91	0,86	1,25	25,71	71,34	38,38	52,98
SC ½ t + LAB ½ t	5,79	1,52	0,29	2,39	391,99	19,03	1,43

Tabelle 28: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	6,18	4,86	4,86	4,86	4,86	4,86	136,79
LAB	0,56	0,69	1,19	3,48	0,95	1,13	0,00
LAB + SC	1,54	14,17	1,69	4,25	2,45	3,37	255,87
LAB ½ t + SC ½ t	0,76	6,38	0,43	27,71	8,99	4,94	168,66
SC ½ t + LAB ½ t	0,29	3,61	15,37	1,88	0,97	3,29	344464,26

Tabelle 29: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	8,65	0,04	33,00	8,87	3,26	8,32	3,86
LAB	0,31	0,00	1,07	0,87	1,06	0,63	194,62
LAB + SC	0,96	0,01	1,94	7,66	4,75	3,64	7,32
LAB ½ t + SC ½ t	1,34	6389,40	2,12	5,49	2,94	10,06	2,60
SC ½ t + LAB ½ t	1,94	0,01	2,37	9,34	11,95	9,54	2,53

Tabelle 30: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	10,63	29,97	29,97	3,77	1,83	3,77	25,85
LAB	0,51	13,68	1,32	0,46	1,76	4,03	0,37
LAB + SC	0,05	26,35	3,95	8,78	1,93	8,45	12,39
LAB ½ t + SC ½ t	0,48	2,74	3,71	1,29	3,98	3,09	8,09
SC ½ t + LAB ½ t	3,48	5,17	8,25	9,33	34,44	12,29	33,97

Tabelle 31: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	11,39	14,82	14,82	6,58	14,82	14,82	490,47
LAB	1,21	0,70	0,42	1,05	0,59	0,37	5,50
LAB + SC	8,29	7,87	1,36	16,47	10,40	12,58	90,85
LAB ½ t + SC ½ t	6,76	1,61	1,45	16,55	2,52	0,98	17,93
SC ½ t + LAB ½ t	7,84	7,83	15,95	6,95	5,66	8,60	29925,69

Tabelle 32: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	40,19	0,46	6,41	0,00	0,09	0,00	0,34
LAB	0,00	0,00	0,00	3,16	1,86	20,57	0,00
LAB + SC	0,50	0,01	1,12	62,23	0,23	1,13	0,00
LAB ½ t + SC ½ t	0,36	4759,30	1,45	24,04	0,03	0,00	0,72
SC ½ t + LAB ½ t	3,80	0,01	0,77	50,42	123,98	20,42	23,31

Tabelle 33: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	0,02	0,29	0,29	3,53	3,53	3,53	0,00
LAB	0,02	90,21	1,08	0,06	21,13	0,00	0,00
LAB + SC	0,01	0,00	8,46	1,81	0,15	0,10	113,58
LAB ½ t + SC ½ t	0,03	28,79	4,88	0,00	0,08	6,56	29,99
SC ½ t + LAB ½ t	0,05	0,00	4,44	0,00	34,71	0,00	0,00

Tabelle 34: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	1
SC 5314	3,25	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
LAB	0,00	0,11	0,10	0,18	1,25	0,12	0,00
LAB + SC	0,57	0,17	0,01	0,67	0,02	0,28	63,34
LAB ½ t + SC ½ t	0,31	2,34	0,60	0,39	0,66	2,82	0,00
SC ½ t + LAB ½ t	16,06	1,28	0,25	6,98	2,08	0,05	119471,96

Tabelle 35: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	
SC 5314	0,01	0,09	0,11	0,24	0,02	0,24	
LAB	0,01	0,04	3,27	0,04	0,53	0,03	
LAB + SC	0,08	0,09	0,00	0,01	1,42	0,00	
LAB ½ t + SC ½ t	0,00	1487,79	0,00	0,86	0,19	15,72	
SC ½ t + LAB ½ t	0,17	0,06	0,03	0,19	35,33	0,29	

Tabelle 36: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN-γ nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	
SC 5314	0,82	0,81	0,81	0,23	0,23	2,30	
LAB	0,81	0,00	3,95	0,01	0,14	2,80	
LAB + SC	0,77	203,61	23,68	0,38	0,10	0,09	
LAB ½ t + SC ½ t	0,53	80,56	13,64	0,23	0,07	0,28	
SC ½ t + LAB ½ t	1,73	5,96	0,00	1,50	8,98	16,39	

Tabelle 37: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN-γ nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

	Actimel	LC1	Yakult	LGG	Wildtyp A	Laktat	LGG inaktiv
PBS	1	1	1	1	1	1	
SC 5314	0,00	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	
LAB	3,33	0,31	5,77	7,64	0,26	2,31	
LAB + SC	0,57	0,51	0,75	0,13	0,05	0,93	
LAB ½ t + SC ½ t	0,31	0,11	0,05	3,14	1,94	0,41	
SC ½ t + LAB ½ t	0,00	3,77	0,75	0,18	0,39	0,14	

Tabelle 38: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN-γ nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

<i>L. casei defensis</i>	12h	24h	36h
PBS	61 U/I	131 U/I	165 U/I
SC5314	104	196	530
<i>L. casei defensis</i>	77	131	186
<i>L. casei defensis</i> + SC5314	84	176	284
$^{1/2}$ t <i>L. casei defensis</i> + $^{1/2}$ t SC5314	89	155	274
$^{1/2}$ t SC5314 + $^{1/2}$ t <i>L. casei defensis</i>	89	197	373

Tabelle 39: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. casei defensis* (12, 24 und 36h)

<i>L. casei shirota</i>	12h	24h	36h
PBS	58 U/I	96 U/I	108 U/I
SC5314	170	231	270
<i>L. casei shirota</i>	85	91	142
<i>L. casei shirota</i> + SC5314	81	134	202
$^{1/2}$ t <i>L. casei shirota</i> + $^{1/2}$ t SC5314	90	134	174
$^{1/2}$ t SC5314 + $^{1/2}$ t <i>L. casei shirota</i>	164	143	342

Tabelle 40: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. casei shirota* (12, 24 und 36h)

<i>L. johnsonii</i> LA1	12h	24h	36h
PBS	50 U/I	171 U/I	108 U/I
SC5314	102	283	270
<i>L. johnsonii</i> LA1	50	176	171
<i>L. johnsonii</i> LA1+ SC5314	58	234	195
$^{1/2}$ t <i>L. johnsonii</i> LA1+ $^{1/2}$ t SC5314	59	209	165
$^{1/2}$ t SC5314 + $^{1/2}$ t <i>L. johnsonii</i> LA1	96	236	213

Tabelle 41: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. johnsonii* LA1 (12, 24 und 36h)

<i>L. acidophilus</i>	12h	24h	36h
PBS	50 U/I	171 U/I	108 U/I
SC5314	102	283	270
<i>L. acidophilus</i>	50	176	171
<i>L. acidophilus</i> + SC5314	58	234	195
$^{1/2}$ t <i>L. acidophilus</i> + $^{1/2}$ t SC5314	59	209	165
$^{1/2}$ t SC5314 + $^{1/2}$ t <i>L. acidophilus</i>	96	236	213

Tabelle 42: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. acidophilus* (12, 24 und 36h)

<i>L. rhamnosus</i> GG	12h	24h	36h
PBS	85 U/l	171 U/l	108 U/l
SC5314	160	283	302
<i>L. rhamnosus</i> GG	104	174	166
<i>L. rhamnosus</i> GG + SC5314	134	207	196
$\frac{1}{2}$ t <i>L. rhamnosus</i> GG + $\frac{1}{2}$ t SC5314	112	225	178
$\frac{1}{2}$ t SC5314 + $\frac{1}{2}$ t <i>L. rhamnosus</i> GG	143	255	270

Tabelle 43: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. rhamnosus* GG (12, 24 und 36h)

D-Laktat (Laktat)	12h	24h	36h
PBS	76 U/l	147 U/l	108 U/l
SC5314	112	283	270
D-Laktat	99	155	148
D-Laktat + SC5314	104	162	198
$\frac{1}{2}$ t D-Laktat + $\frac{1}{2}$ t SC5314	95	171	173
$\frac{1}{2}$ t SC5314 + $\frac{1}{2}$ t D-Laktat	111	200	276

Tabelle 44: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für D-Laktat (12, 24 und 36h)

<i>L. rhamnosus</i> GG inaktiv (LGGi)	12h	24h	36h
PBS	45 U/l	58 U/l	68 U/l
SC5314	67	167	267
LGGi	81	129	180
LGGi + SC5314	47	93	119
$\frac{1}{2}$ t LGGi + $\frac{1}{2}$ t SC5314	61	97	107
$\frac{1}{2}$ t SC5314 + $\frac{1}{2}$ t LGGi	53	132	169

Tabelle 45: Übersicht über die ermittelten LDH-Werte für *L. rhamnosus* GG inaktiv (12, 24 und 36h)

8.2 Abbildungen

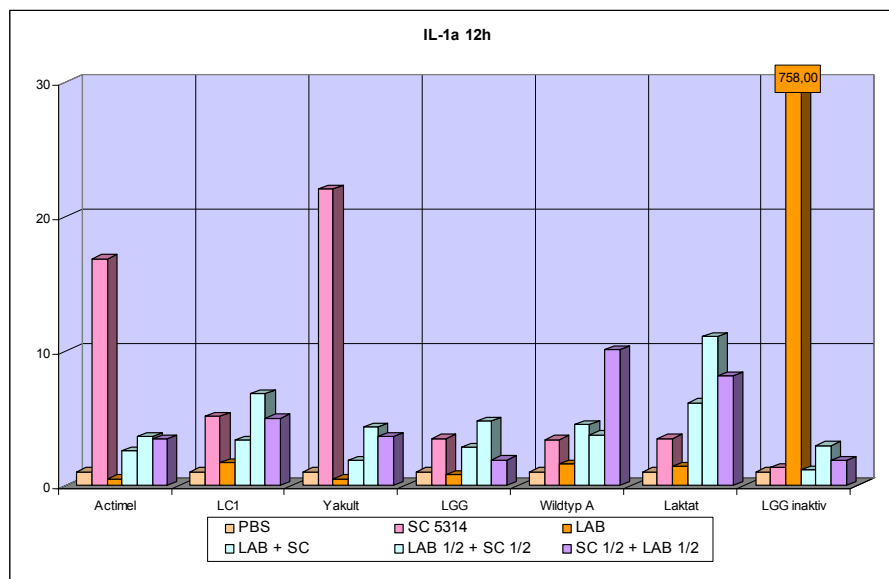


Abbildung 27: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

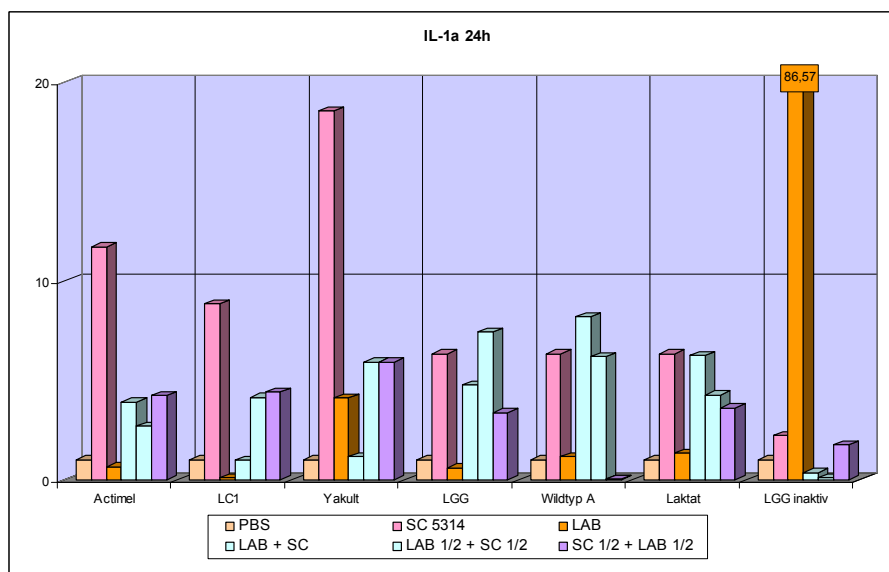


Abbildung 28: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

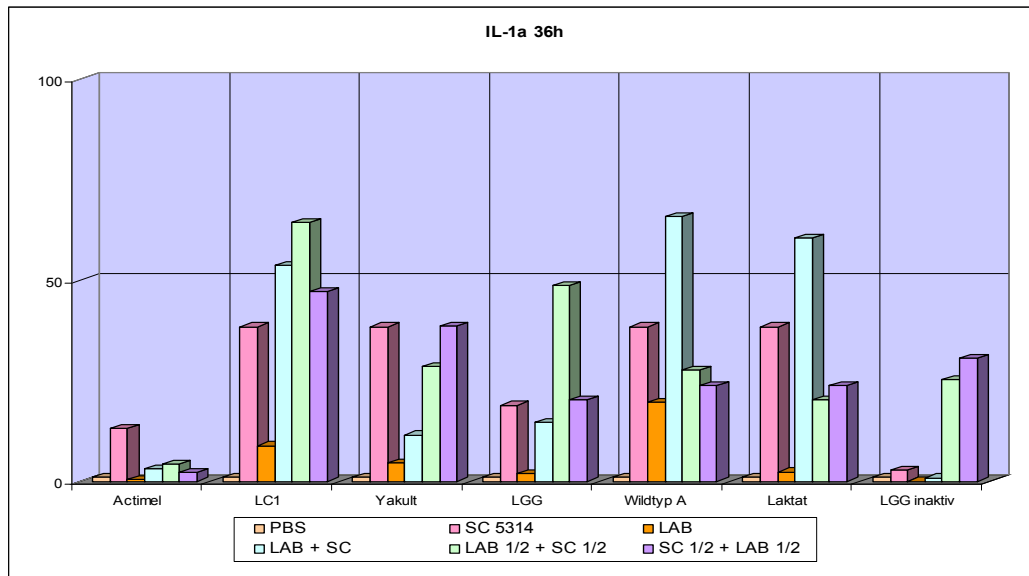


Abbildung 29: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 α nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

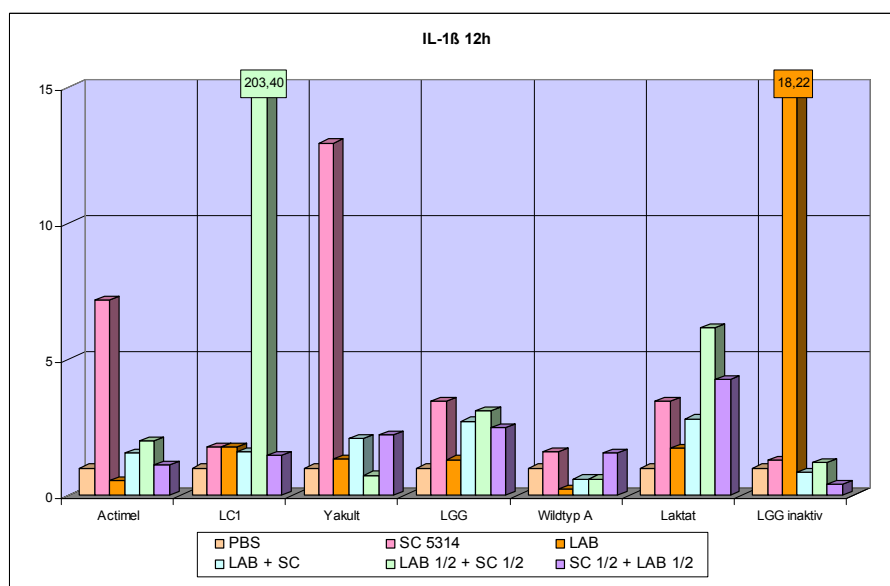


Abbildung 30: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

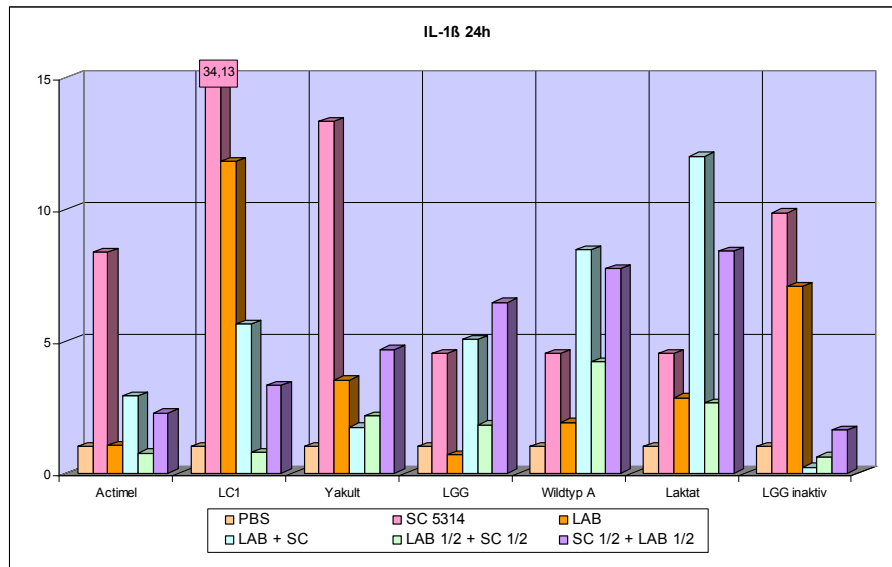


Abbildung 31: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

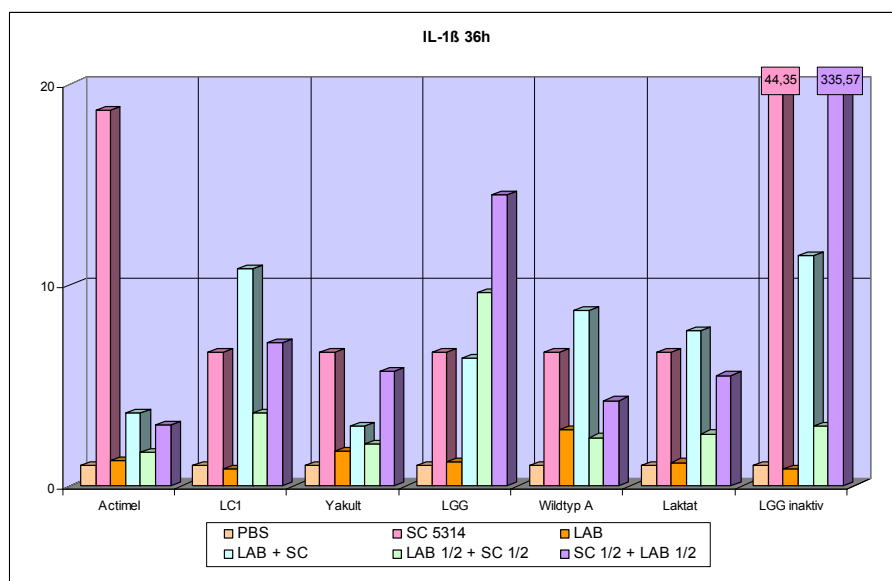


Abbildung 32: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-1 β nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

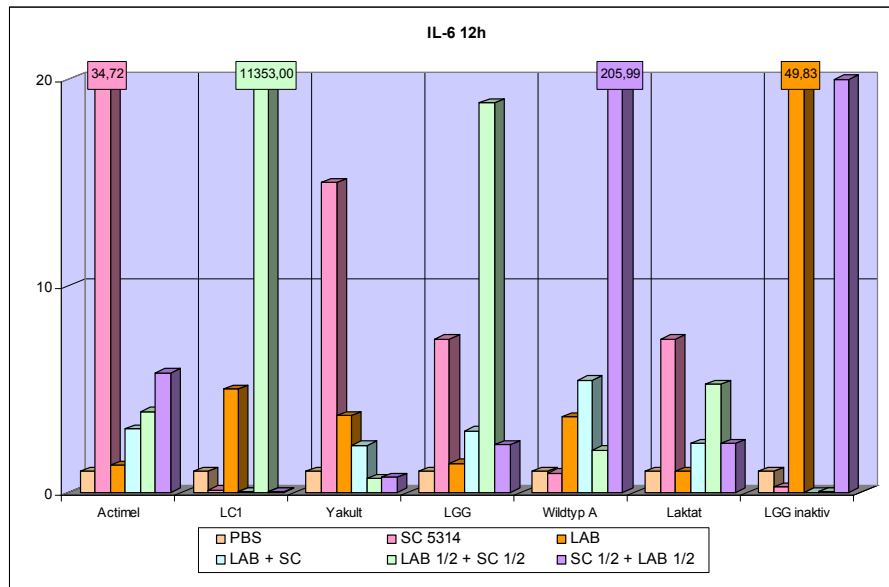


Abbildung 33: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

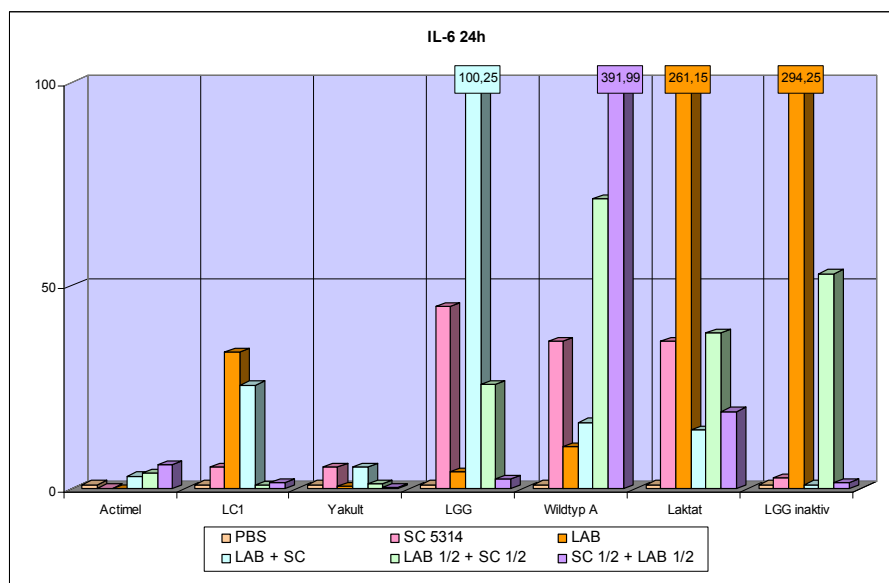


Abbildung 34: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

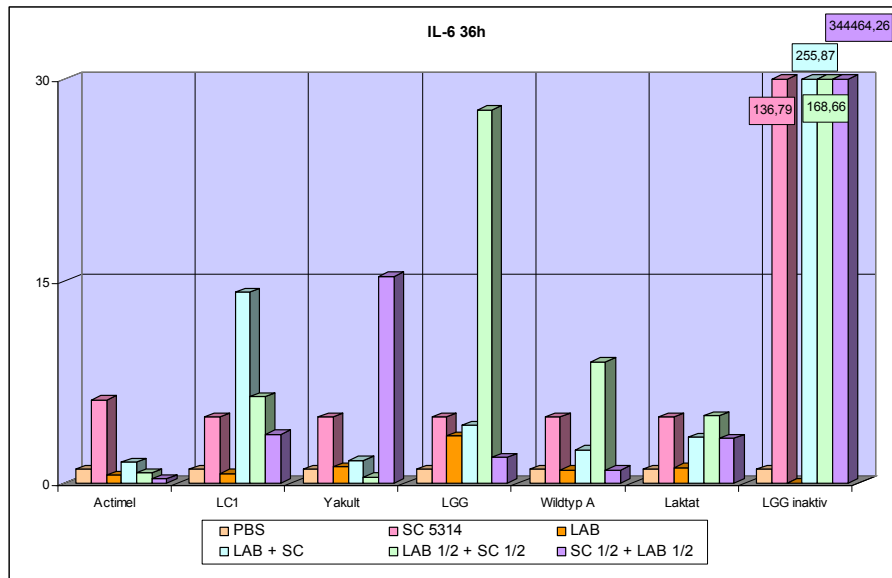


Abbildung 35: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-6 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

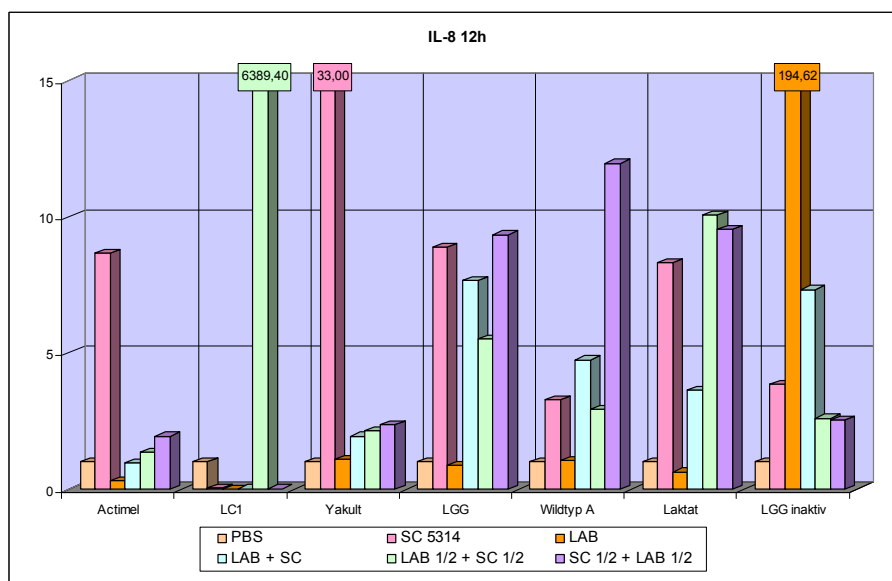


Abbildung 36: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

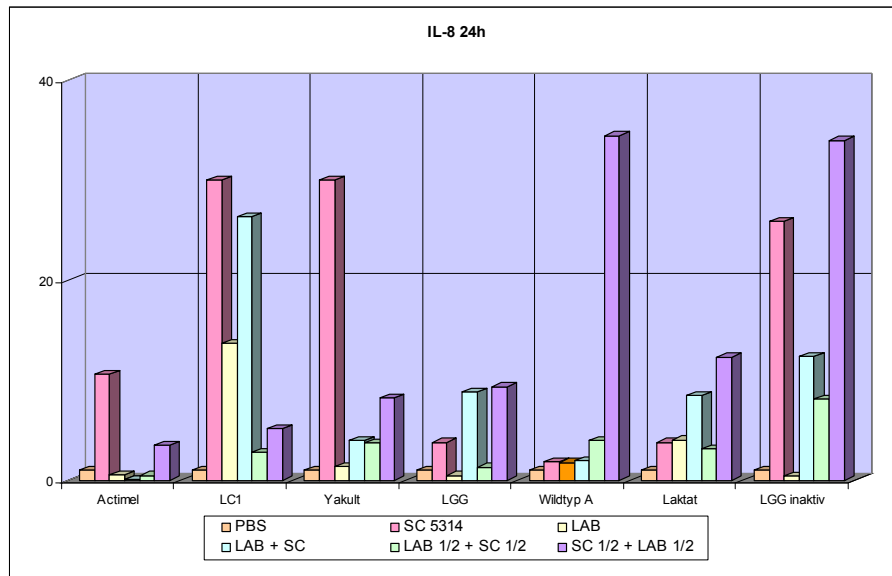


Abbildung 37: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

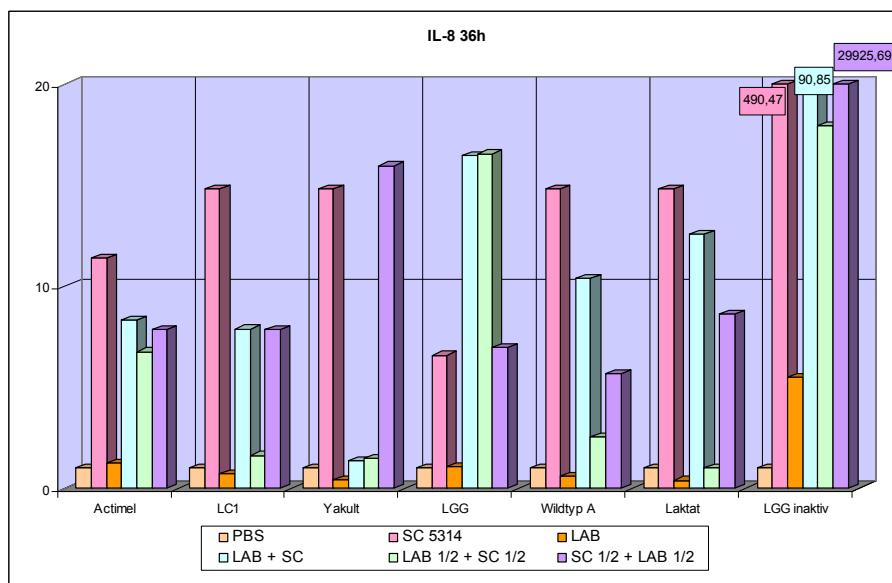


Abbildung 38: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-8 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

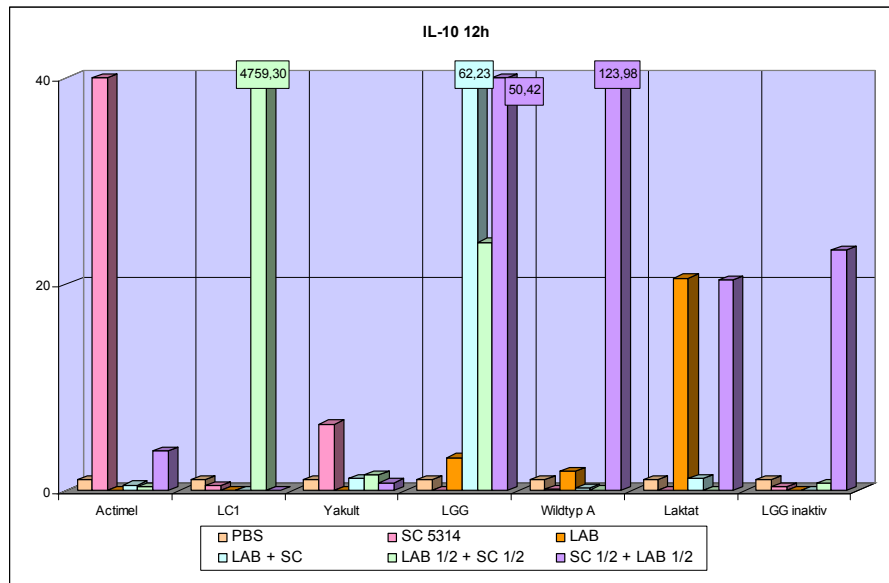


Abbildung 39: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

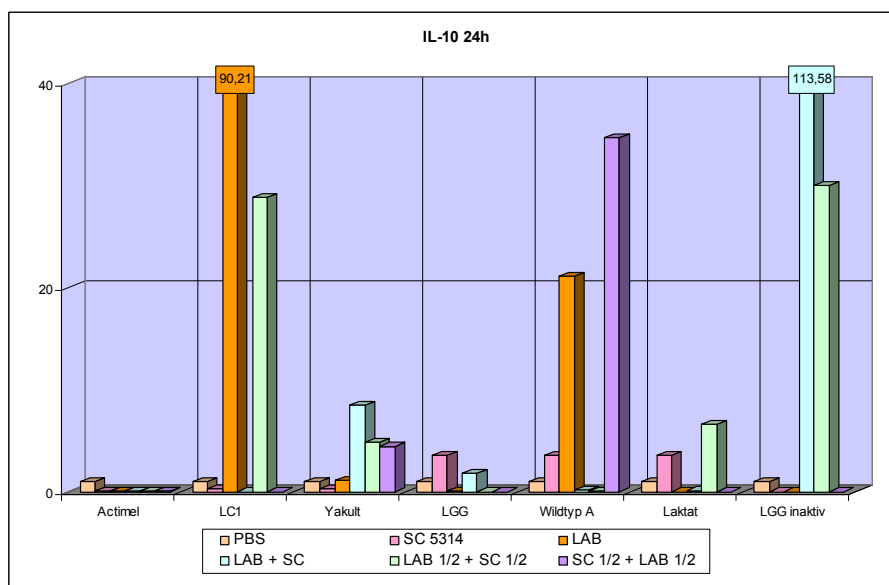


Abbildung 40: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

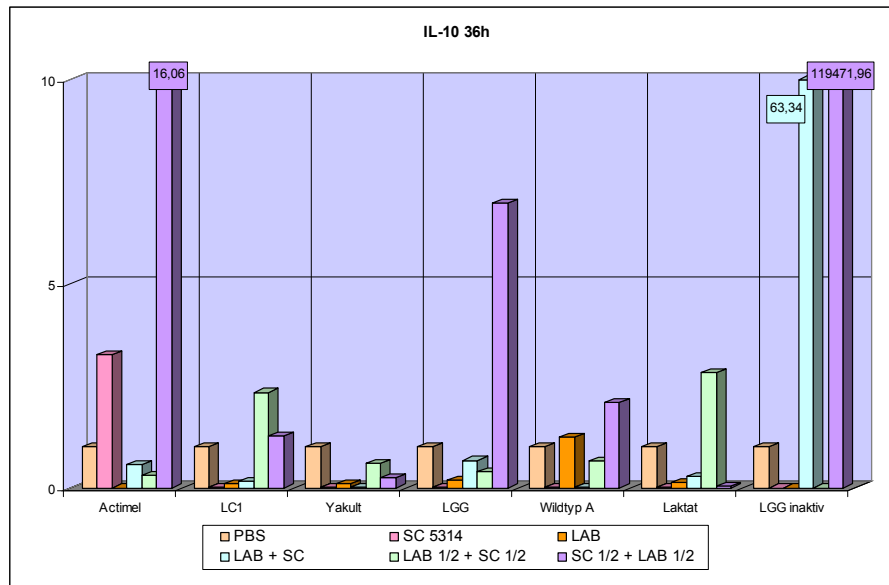


Abbildung 41: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IL-10 nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

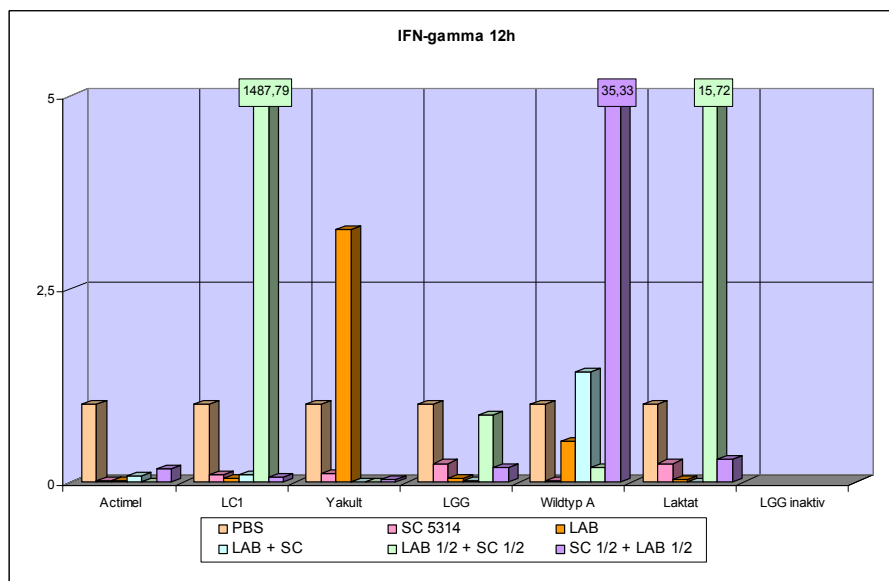


Abbildung 42: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 12 Stunden

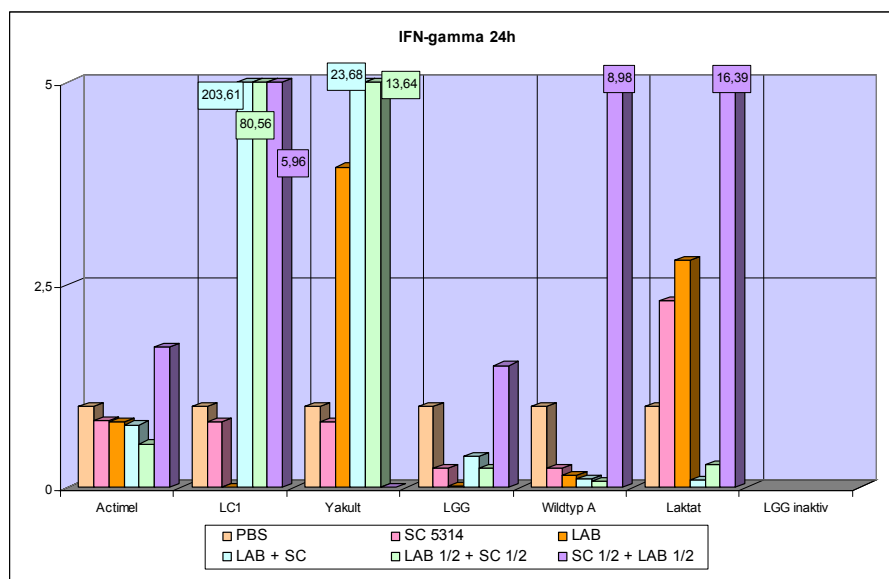


Abbildung 43: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 24 Stunden

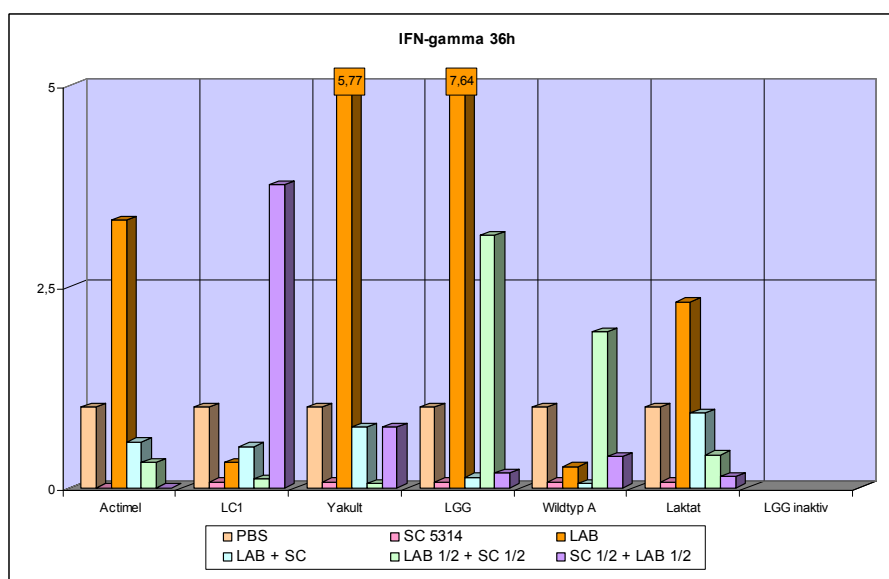


Tabelle 44: Ergebnisse der relativen Quantifizierung für IFN- γ nach einem Untersuchungszeitraum von 36 Stunden

9 Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft für Infektionen und Infektionsimmunologie in der Gynäkologie und Geburtshilfe der DGGG. Leitlinie Vulvovaginal-Kandidose. Frauenarzt 2003; 44:781-785
2. Bluestein D, Rutledge C, Lumsden L (1991) Predicting the occurrence of antibiotic-induced candidal vaginitis. Fam Pract Res J 11: 319-326
3. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Mateau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V (2003) Safety of probiotics that contain Lactobacilli or Bifidobacteria. Clin Inf Dis 36: 775-780
4. Chimura T, Funayama T, Murayama M, Numazaki M (1995) Ecological treatment of bacterial vaginosis. Jpn J Antibiot 48: 432-436
5. Clements ML, Levine MM, Black RE, Robins-Browne RM, Cisneros LA, Drusano GL (1981) Lactobacillus prophylaxis for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 20: 104-108
6. Clements ML, Levine MM, Ristaino PA, Daya VE, Hughs TP (1983) Exogenous lactobacilli fed to man – their fate and ability to prevent diarrheal disease. Prog Food Nutr Sci 7: 29-37
7. De Angelis M, Gobbetti M (2004) Environmental stress responses in Lactobacillus: A review. Proteomics 4: 106-122
8. de Vrese M, Schrezenmeir J (2002) Probiotics and non-intestinal infectious conditions. Br J Nutr 88, Suppl. 1: S59-S66
9. Dewit O, Pochart P, Desjeux JF (1988) Breath hydrogen concentration and plasma glucose, insulin and free fatty acid levels after lactose, milk, fresh or heated yoghurt ingestion by healthy young adults with or without lactose malabsorption. Nutrition 4: 131 – 136
10. Döderlein A. (1892) Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. Centralblatt für Bacteriologie 11: 699-700

11. Dupont B, Improvisi I, Dromez F (2000) Recurrent vulvovaginal Candidiasis (RVVC) due to *C. albicans*: Epidemiology and Treatment with Fluconazole, 14th ISHAM meeting 2000, May 8-12, Buenos Aires, Abstracts, 178
12. Felley CP, Cortesy-Theulaz I, Rivero JL, Sipponen P, Kaufmann M, Bauernfeind P (2001) Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Europ J Gastroenterol Hepatol* 13: 25-29
13. Fidel PL Jr. (2002) Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 40: 359 – 375
14. Friesse K, Mendling W (1996) Therapie der vaginalen Kandidose – oral vs. lokal, *Gynäkologe* 29: 221-228
15. Fuller R (1989) Probiotics in man and animals, *J Appl Bacteriol* 66: 365 – 378
16. Gillum, AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198:179-182.
17. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B (1987) Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. *Lancet* ii: 1519
18. Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW (1979) Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a lactobacillus preparation. *Am J Hosp Pharm* 36: 754-757
19. Granger SE (1992) The Aetiology and Pathogenesis of Vaginal Candidosis: An Update. *Br J Clin Pract* 46: 258-259
20. Hallen A, Jarstrand C, Pahlson C (1992) Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. *Sexually Transmitted Dis* 19: 146-148
21. Havenaar R, Huis in't Veld JHJ (1992) Probiotics: general view. The lactic acid bacteria. In: Wood BJB (Ed.) *Lactic acid bacteria in health and disease*. Vol. 1: 151-171. London: Elsevier Applied Science.

22. Heyman M, Ménard S (2002) Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 59: 1151-1165
23. Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT (1992) Ingestion of yoghurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Ann Intern Med* 116: 353-357
24. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, *Am J Clin Nutr*, 73 Suppl 2: 365S-373S
25. Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Moilanen E, Salminen S (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30: 1604-1610
26. Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E (2001) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1076-1079
27. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361: 1869-1871.
28. Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for the use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137-138
29. Kolars JC, Lewitt MD, Aouji M and Savaiano DA (1984) Yoghurt – an autodigesting source of lactose. *N Engl J Med* 310: 1-3
30. Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY (2004) Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol Letters* 239: 267 – 275
31. Lilly DM and Stillwell RH (1965) Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms, *Science* 147: 747 – 748
32. Luft JH (1961) Epoxy resins. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 409-414

33. Matsuzaki T, Chin J (2000) Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol* 78: 67-73
34. McGroarty JA, Reid G (1988) Detection of a *Lactobacillus* substance which inhibits *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 34: 974-978
35. Merk K, Borelli C, Schaller M, Korting HC (2004) Laktobazillen als Probiotika zur Behandlung urogenitaler und intestinaler Infektionen sowie zur Vorbeugung und Therapie von allergischen Erkrankungen. *J Dtsch Dermatol Ges* 2: 752 – 757
36. Metchnikoff E (1908). The prolongation of life. Optimistic studies, Putmans Sons, New York, NY.
37. Morschhäuser J, Blum-Oehler G, Hacker J (1997) Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies. *Med Welt* 48: 352-357
38. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273
39. Odds FC (1988) *Candida* and Candidosis. Baillière Tindall, London, Second Edition
40. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S (1999) Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J*, 9: 43-52
41. Ozkinay E, Terek MC, Yayci M, Kaiser R, Grob P, Tuncay G (2005) The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections. *Br J Obstet Gynecol* 112: 234-240
42. Parent D, Bossens M, Bayot D, Kirkpatrick C, Graf F, Wilkinson FE, Kaiser RR (1996) Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied *Lactobacilli acidophili* and a low-dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial. *Arzneimittelforschung* 46: 68-73
43. Parker RB (1974) Probiotics, the other half of the antibiotic story, *Anim Nutr Health* 29: 4 - 8
44. Pschyrembel W (1997) *Klinisches Wörterbuch*. De Gruyter, Berlin, 258. Auflage

45. Reid G, Bruce AW (1995) Low vaginal pH and urinary-tract infection. *Lancet* 346: 1704
46. Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J and Henning B (2001) Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 30: 49-52
47. Reid G, Tieszer C, Lam D (1995) Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *J Ind Microbiol* 15: 248-253
48. Roche Applied Science Homepage: www.roche-applied-science.com/pcr/principles
49. Roche Applied Science Homepage: www.roche-applied-science.com/techresources/lc
50. Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen DL, Valerius NH, Paerregaard A (2003) Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111: 389-395
51. Salminen S, Deighton MA, Benno Y, Gorbach SL (1998) Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen S, Von Wright A, eds *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd ed. New York; Marcel Dekker Inc, 1998: 211-253
52. Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee YK (1999). Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Sci Technol* 10: 107-110
53. Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fondén R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland, SE, Mattila-Sandholm T (1998). Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int J Food Microbiol*, 44: 93-106
54. Samra OM, Mancini DM, Wood E (2002) Vulvovaginitis. *eMedicine Journal* 3: 1-11
55. Savaiano DA, AbouElAnouar A, Smith DE, Levitt MD (1984) Lactose malabsorption from yoghurt, pasteurized yoghurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 40: 1219-1223
56. Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, Beinhauer S, Hube B (2002) The Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 and Sap2 cause Tissue Damage in an In Vitro Model of Vaginal Candidiasis Based on Reconstituted Human Vaginal Epithelium. *Infect Immun* 71: 3227-3234

57. Schaller M, Hube B (2004) *Candida albicans*-Infektionsmodelle. BIOforum 11: 2 – 3
58. Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC (2002) Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. J Invest Dermatol 118: 652 – 657
59. Schrezenmeier J, de Vrese M (2001) Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. Am J Clin Nutr 73: 361s-364s
60. Schrezenmeier J, de Vrese M (2002) Probiotics and non-intestinal infectious conditions, Br J Nutr, 88, Suppl 1: S59 – S66
61. Shimp LA (2000) Vaginal and Vulvovaginal Disorders. In: Allen LV et al., ed. Handbook of Nonprescription Drugs. American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., Vol. 12: 117-132
62. Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S, Gordin A, Saxelin M, Wikberg R (1990) Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. Ann Med 22: 57-59
63. Sobel JD (1993) Candidal vulvovaginitis. Clin Obstet Gynecol 36: 153-165
64. Steele C, Fidel PL (2002) Cytokine and Chemokine Production by Human Oral and Vaginal Epithelial Cells in Response to *Candida albicans*, Infect Immun 70, 577-583
65. Stiles EM, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int J Food Microbiol 36:1-29
66. Taylor BN, Saavedra M, Fidel PL Jr. (2000) Local Th1/Th2 cytokine production during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth factor-beta. Med Mycol 38: 419 – 431
67. Tietz HJ (2002) Therapy problems in chronic recurrent vaginal mycosis, Ther Umsch 59: 481-484
68. Tietz HJ, Mendling W (2001) Haut- und Vaginalmykosen, Blackwell Berlin

-
69. Tissier H (1906). Taxonomy and ecology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 3: 11-28
 70. Vandesompele J, De Preter K, Patty F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 (7): research 0034.1-0034.11
 71. Wroblewski F, John LS (1955) Lactic dehydrogenase activity in blood, *Exp Biol Med* 90: 210-213
 72. Zhang X, Essmann M, Burt ET, Larsen B (2000) Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. *J Infect Dis* 181: 1441-1446

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen denjenigen danken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben und denen ich das Gelingen dieser Arbeit zu verdanken habe.

Recht herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med H. C. Korting für die Überlassung des interessanten Themas, für die ständige Betreuung sowie den regen Austausch, besonders bei den Laborbesprechungen der MolPathCand bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Kathrin Merk. Vielen Dank für die liebenswerte und zu jeder Zeit äußerst geduldige Betreuung von der Einarbeitung bis zur lang ersehnten Fertigstellung, die aufmunternden Worte und für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Ich möchte mich sehr bei Frau Januschke, Frau Laude und Frau Kieslinger aus der Elektronenmikroskopie für die Einarbeitung in die in dieser Arbeit angewendeten Techniken der Laborarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Zeit bedanken, die ich mit ihnen verbringen durfte.

Ein ganz spezieller Dank gilt Frau Karin Fanderl und Frau Anette Kerschnitzki aus dem Mykologischen Labor für die stets fröhliche Atmosphäre sowie die aufmunternden Worte in sämtlichen Lebenslagen.

Meiner lieben Kollegin Barbara Beifuß gilt ein ganz besonderer Dank für die äußerst angenehme und fröhliche Zeit in „unserem“ Candida-Labor sowie im täglichen Kampf gegen die Widrigkeiten des Laboralltags.

Nicht zuletzt möchte ich meiner lieben Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder danken. Ihr habt mich stets bedingungslos unterstützt und mir das Absolvieren des langen und häufig für alle anstrengenden Studiums und das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht. Ohne Euch hätte ich dies alles niemals geschafft.

Meiner lieben Freundin Sophie danke ich von ganzem Herzen für Ihre Motivation, Ihre Geduld, Ihre Unterstützung und ganz besonders für Ihre Liebe.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben	Name:	Wolf-Georg Schulz
	Geburtsdatum:	16. März 1978
	Geburtsort:	Managua/Nicaragua
	Vater:	Wolf-Detlef Schulz, Fernmeldetechniker
	Mutter:	Maria-Isabel Schulz, geb. Zambrano, Hausfrau
	Geschwister:	Claus-Detlef Schulz, Groß- und Außenhandels-Kaufmann
	Familienstand:	ledig
Schul Ausbildung	1984 - 1988	Grundschule, München
	1988 – 1997	Städt. Thomas-Mann-Gymnasium, München
	1997	Abitur
Zivildienst	1997 - 1998	Dermatologische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Hochschul- ausbildung	1998 - 2004	Studium der Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
	Oktober 1999	Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung
	Oktober 2001	Zahnärztliche Vorprüfung
	Juni 2004	Zahnärztliche Prüfung, Approbation als Zahnarzt
Dissertation	seit September 2004	Dermatologische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München „Einfluss unterschiedlicher Laktobazillen-Arten auf die experimentelle Vaginalkandidose durch <i>C. albicans</i> “
Beruflicher Werdegang	04/2005 – 06/2007	Assistenz Zahnarzt in allgemein zahnärztlicher Praxis (Praxis Dr. Michael Roidl, Penzberg)
	seit 07/2007	Zahnärztliche Gemeinschaftspraxis Katja Tautrim und Wolf-Georg Schulz, Kochel am See